

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

PUBLIÉES PAR

LA DIRECTION DE L'INSTITUT PASTEUR

Avec le concours des Chefs de Service
et des Chefs de Laboratoire

Secrétaire général : P. LÉPINE

TOME QUATRE-VINGT-HUITIÈME

Janvier-Juin 1955

QR-

1

A475

V.88

Jan.-June

1955

PER

MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS

Libraires de l'Académie de Médecine

120, Boulevard Saint-Germain

PARIS

PARIS. — ANC. IMP. DE LA COUR D'APPEL, 4, RUE CASSETTE. — 1955

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDE SUR LA TRANSMISSION EXPÉRIMENTALE DE LA MYXOMATOSE AU LIÈVRE.

par H. JACOTOT, A. VALLÉE et B. VIRAT (*).
(Aides-Techniques : A. LE PRIOL et NOËLLE PINHEDE)

(Institut Pasteur. Service de Microbiologie Animale.)

Jusqu'à l'année dernière, il n'avait été signalé aucun cas de transmission naturelle de la myxomatose au lièvre et, sur le plan expérimental, seuls Kessel, Fisk et Prouty considéraient cette transmission comme possible, encore qu'exceptionnelle [1].

Au cours de l'été 1953, qui fut marqué, on le sait, par l'extension à la presque totalité du territoire français de l'épizootie partie d'Eure-et-Loir en 1952, quelques lièvres ont été trouvés atteints de myxomatose caractérisée et 3 de ces animaux ont fait l'objet d'observations qui ont été publiées [2, 3, 4].

Nous nous sommes proposé, sinon d'obtenir la réalisation problématique de la maladie dans cette espèce, du moins d'y étudier les effets de l'inoculation du virus de Sanarelli.

Nos essais ont porté sur un ensemble de 13 lièvres, dont 5 lièvres français capturés dans le Loiret, 1 lièvre d'Alsace et 7 lièvres d'Europe Centrale (1).

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 7 octobre 1954.

(1) Les lièvres du Loiret et le lièvre d'Alsace ont été mis à notre disposition par le Conseil Supérieur de la Chasse ; nous prions son secrétaire général, M. le conservateur Vidron, et M. l'ingénieur Barthélemy, de trouver ici l'expression de notre vive gratitude.

Le tableau I résume les inoculations effectuées et les suites qu'elles ont eues chez les lapins témoins.

Parmi les lièvres de la dernière série, importés d'Europe Centrale, les trois premiers, nos 288, 289, 290, ont reçu, le jour de l'inoculation virulente, et les deux jours suivants, chaque fois 25 mg de cortisone par voie musculaire, cela en vue d'ébranler leur résistance au virus.

Plusieurs animaux, qui seront désignés plus loin, ont subi dans la suite une ou plusieurs réinoculations virulentes.

Enfin, il serait superflu de souligner que l'état de captivité est,

TABLEAU I. — Tableau récapitulatif des inoculations effectuées.

I - 5 lièvres français du Loiret. Nos 98-99-100-201-202. (20.11.53)	Sous la peau des cuisses 10.000 d.m.m. virus prélevé sur un lapin mort de myxom. naturellement contractée dans la Dordogne Le lapin témoin (n°204) meurt de myxomatose en 11 jours.	Dans l'épaisseur des paupières supérieures 12 d.m.m. virus prélevé sur un lièvre mort de myxomatose naturellement contractée dans le Loir et Cher. Le lapin témoin (n°265) meurt de myxomatose en 9 jours.
II - 1 lièvre d'Alsace (1.10.53)	A la base de chaque oreille 10.000 d.m.m. virus prélevé sur un lapin mort de myxom. naturellement contractée dans la Sarthe Les lapins témoins (Nos 441 et 900) meurent de myxomatose en 9 et 11 jours.	Sous la peau du front 100 d.m.m. même virus lièvre que ci-dessus. Le lapin témoin (n°899) meurt de myxomatose en 11 jours.
III - 1 lièvre importé d'Europe centrale (6.5.53)	Sous la peau du front 1.000 d.m.m. virus prélevé sur un garenne mort de myxomatose naturellement contractée dans le Cher. Les lapins témoins (Nos 854 et 804) meurent de myxomatose en 10 et 12 jours.	
IV - 6 lièvres importés d'Europe centrale Nos 288-289-290-291-292-293 (20.12.53)	Sous la peau du front 1.000 d.m.m. virus prélevé sur un lapin myxomateux contaminé par des moustiques. Les lapins témoins (Nos 279 et 290) meurent de myxomatose en 11 et 12 jours.	Dans chaque testicule 125 d.m.m. du virus ci-contre. Par frictions et pigres de la peau de la croupe après épilation, avec même virus que ci-contre. Les lapins témoins (Nos 281 et 282) meurent de myxomatose en 12 jours.

pour le lièvre, un facteur de diminution de la résistance aux infections et infestations. Aussi bien, tous nos animaux d'expérience sauf un sont-ils morts successivement, et dans les délais suivants : onze jours, quinze jours, seize jours, dix-huit jours, vingt-deux jours, trente et un jours, trente-deux jours [3], quarante-neuf jours, cinquante-quatre jours, soixante-quatre jours. Plusieurs étaient porteurs de nombreuses coccidies ; six étaient

atteints de pasteurellose et deux d'affections pyogènes consécutives à des blessures par la cage. Un seul, provenant d'Europe Centrale, a survécu, restant en parfait état.

CONSTATATIONS CLINIQUES.

Aucune manifestation pathologique, aucun indice de trouble morbide qu'on ait pu rapporter à l'action du virus de Sanarelli n'ont été observés à la suite de l'inoculation virulente.

Par souci de réduire au minimum les manipulations d'un matériel animal aussi rare et aussi fragile, on s'est abstenu de prendre les températures. Elles ne sont d'ailleurs qu'un signe discret et accessoire chez les lapins, pourtant hautement sensibles à la myxomatose.

Localement, au niveau de l'inoculation frontale, le lièvre 292 a présenté un petit nodule, qui était constitué le cinquième jour et qu'on a réséqué le quinzième jour pour étude.

CONSTATATIONS NÉCROPSIQUES.

A l'autopsie du lièvre 201, on a relevé des lésions de trachéite avec suffusions. Aucune altération macroscopique des tissus ou organes, qui dût être rapportée à la myxomatose, n'a été constatée chez les autres lièvres.

RECHERCHE DU VIRUS DANS L'ORGANISME.

A. LIÈVRES DU LOIRET. — a) Aux cinq animaux de ce groupe, on a fait alternativement des prises de sang pour inoculer des lapins ; chaque lièvre a été saigné de trois à six fois ; chaque jour, du huitième au quatorzième, deux lièvres ont été saignés et le quinzième jour un seulement ; vingt-cinq lapins ont été inoculés, chacun d'eux recevant sous la peau 5 cm³ de sang de lièvre. Aucun de ces lapins n'a contracté la maladie, et tous sont morts ultérieurement de myxomatose, après inoculation virulente de contrôle.

b) Indépendamment de cela, les lièvres 201 et 99 ont fait l'objet de recherches particulières parce qu'ils sont morts onze jours et quinze jours seulement après l'inoculation du virus de Sanarelli.

A l'autopsie du lièvre 201, on relève une infestation grave par coccidies, qui s'était traduite, dans les jours précédents, par de la diarrhée ; en outre, comme nous l'avons signalé plus haut, la muqueuse trachéale porte les traces d'une vive inflammation. Disons tout de suite que les ensemencements des diverses parties du cadavre resteront négatifs.

On prélève sang, rate, moelle osseuse, foie, rein, poumon, muqueuse trachéale lésée, des lambeaux de peau dans les régions inoculées et les ganglions voisins. Avec les divers lambeaux de peau (côté chair), on frictionne énergiquement le front, les cuisses, le dos, épilés et légèrement scarifiés, du lapin 89 ; cet animal contracte une myxomatose mortelle en treize jours. Les broyats des autres tissus sont mis en suspension et injectés à sept lapins (n^{os} 256, 57, 58, 59, 61, 84 et 51), qui demeurent indemnes et se montreront ultérieurement réceptifs à la myxomatose.

Le lièvre 99 est mort de pasteurellose, avec localisation pleuro-pulmonaire massive. On a prélevé seulement des lambeaux de peau aux divers points d'inoculation du virus de Sanarelli. Avec ces lambeaux, on procède comme précédemment et sous le couvert de la chloromycétine, à l'inoculation par friction de la peau scarifiée de deux lapins (n^{os} 281 et 282) ; ces animaux restent indemnes et réceptifs à la myxomatose.

B. LIÈVRES D'EUROPE CENTRALE. — a) Le virus a été recherché dans le sang de six lièvres du dernier groupe, selon le protocole appliqué aux lièvres du Loiret. Chaque animal a été saigné quatre fois, et les prises de sang ont été faites chaque jour sur deux lièvres, à partir du troisième jour jusqu'au quatorzième jour inclus. Vingt-quatre lapins ont été inoculés avec les divers échantillons de sang ; tous sont restés indemnes et tous ont contracté ultérieurement une maladie mortelle après inoculation virulente.

b) Après l'inoculation, les neuvième, douzième, quinzième, dix-neuvième et vingt-sixième jours, on a procédé, chaque fois sur deux lièvres, à l'ablation d'un testicule. Immédiatement après, un fragment de chaque glande était broyé, mis en suspension et inoculé à un lapin. La présence du virus a pu être établie, puis confirmée par une inoculation ultérieure des mêmes matériels, dans la substance de testicules prélevés les neuvième jour (lièvre 288), douzième jour (lièvre 289) et quinzième jour (lièvre 290) ; toutes les autres glandes se sont révélées avirulentes (291 du neuvième jour, 293 du douzième, 292 du quinzième, 288 et 291 du dix-neuvième, 289 et 293 du vingt-sixième).

c) La lésion frontale présentée par le lièvre 292, qui avait été conservée en eau glycinée à température basse, a été reprise huit jours après. C'était une petite masse ovale, de 10 x 4 mm, aplatie, pesant 0,50 g, dense, et qui, sous le tranchant du bistouri comme sous la pression du pilon, faisait penser à un fibrome de Shope autant qu'à un myxome. On en fait une suspension au 1/10, dont on injecte 2 cm³ sous la peau d'un lapin neuf ; l'animal contracte une myxomatose typique ; la mort se produit onze jours après l'inoculation.

POUVOIR PATHOGÈNE DU VIRUS ISSU DE L'ORGANISME
DES LIÈVRES DE PASSAGE.

A. LIÈVRES DU LOIRET. — Ainsi que nous l'avons rapporté plus haut, le virus du myxome n'a pu être retrouvé dans la peau (ou le tissu conjonctif sous-cutané) que chez le lièvre 201 ; deux jours après le prélèvement, des lambeaux cutanés de ce lièvre ont donné à un lapin une myxomatose typique, mortelle en quatorze jours ; mais, deux semaines plus tard, des lambeaux de peau semblables conservés à -15° ont laissé deux lapins indemnes et réceptifs à la myxomatose. Le virus de Sanarelli se trouvait donc en faible quantité dans le tissu considéré, et, si l'on tient compte de ce que le lièvre avait succombé onze jours seulement après l'inoculation, on est amené à se demander s'il n'y a pas eu conservation, survie du virus *in situ*, plutôt que multiplication, culture *in vivo* à proprement parler. On a noté déjà que les mêmes opérations, pratiquées avec la peau du lièvre 99 mort quatre jours après le 201, sont restées infructueuses. Pour être complet, et sans attacher à cette constatation une importance qu'elle n'a peut-être pas, nous signalerons que le lièvre 201 avait reçu, au point considéré, du virus de lièvre.

B. LIÈVRES D'EUROPE CENTRALE. — Le virus du myxome était présent dans les testicules des lièvres 288, 289 et 290, neuf jours, douze jours et quinze jours respectivement après l'inoculation. Les lapins qui ont permis de le détecter sont morts de myxomatose ou ont été sacrifiés à une période avancée de la maladie, dans des délais compris entre douze et dix-sept jours, les évolutions les plus rapides correspondant aux inoculations du matériel 288 (testicule prélevé le neuvième jour). Aucune remarque particulière n'a été faite quant aux symptômes et lésions présentés par ces lapins.

Enfin, le lapin qui avait reçu une suspension du myxome frontal prélevé sur le lièvre 292 est mort d'une myxomatose typique onze jours après.

On notera que les trois lièvres dont les testicules se sont révélés virulents avaient reçu de la cortisone ; en revanche, celui qui a fait un petit myxome frontal appartenait au groupe de trois animaux non traités par l'hormone.

ETUDE SÉROLOGIQUE.

Des prises de sang successives ont été faites pour rechercher la présence d'anticorps déviant le complément et, éventuellement, suivre leurs variations. Les cinq lièvres du Loiret et les six derniers lièvres de l'Europe Centrale ont été examinés de ce point de vue. Chez aucun d'eux, à une exception près, la réaction n'a

été positive au cours des trois semaines suivant l'inoculation. L'exception concerne le lièvre 292, qui a présenté un myxome frontal ; quatorze et vingt et un jours après l'inoculation virulente, son sérum contenait une quantité faible mais décelable d'anticorps spécifiques.

Par comparaison, les quatre lapins témoins du deuxième groupe ont tous donné une réaction, faible mais décelable dès le cinquième jour ; cette réaction s'est maintenue, sans variations importantes, jusqu'à la mort des animaux, survenue onze et douze jours après l'épreuve.

Quatre semaines après la première épreuve, les lièvres d'Europe Centrale ont été réinoculés, chacun d'eux recevant 3 000 d. m. m. de virus. Ils n'ont présenté, dans la suite, aucun trouble se rapportant à la myxomatose. On a poursuivi l'examen sérologique de ceux qui ont vécu ensuite assez longtemps (n^{os} 288, 289, 292). Tous les trois ont donné une réaction caractérisée (+ + + au 1/8 ou au 1/16) une semaine plus tard et au-delà ; mais le sérum du 292 ne s'est pas comporté autrement que les deux autres.

Le tableau II groupe les résultats concernant ces trois lièvres et les quatre lapins témoins.

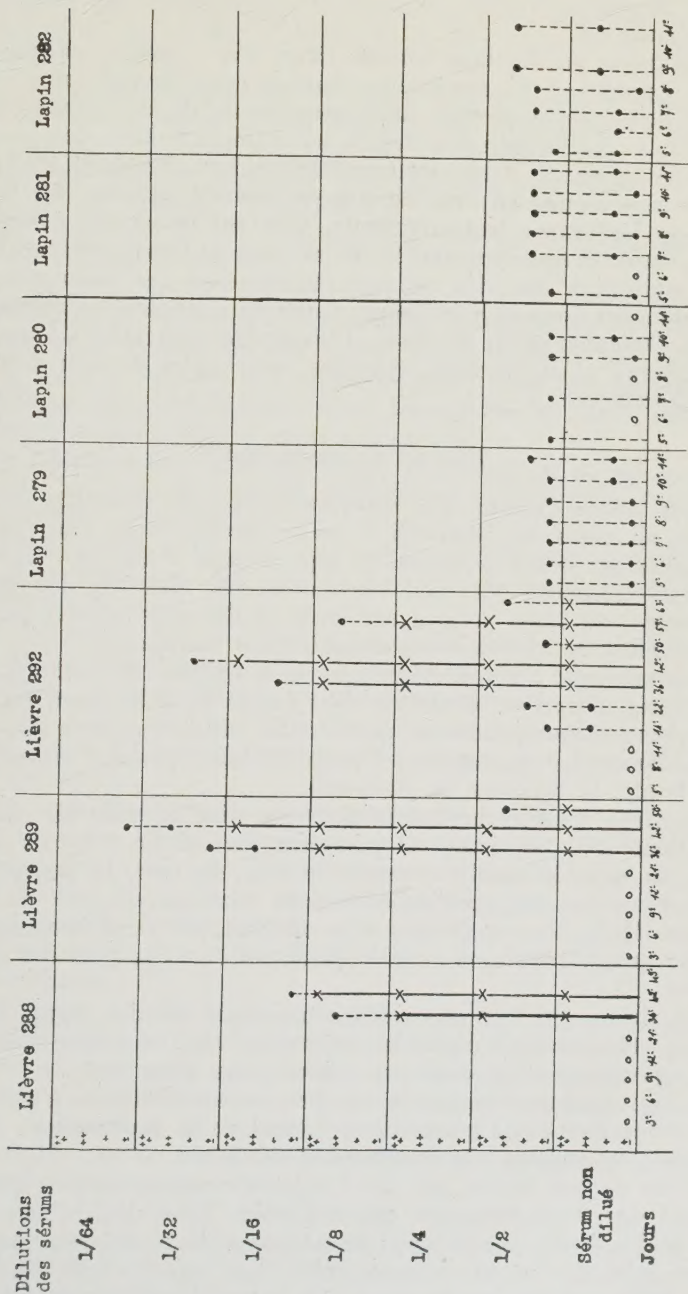
Pour compléter cette étude, nous avons traité de la même manière que les lièvres quatre cobayes, un agneau et un chevreau, tous animaux totalement réfractaires à la myxomatose. Dans un premier temps, les cobayes ont reçu chacun, par voie sous-cutanée, 500 d. m. m. de virus de Sanarelli, et les deux petits ruminants 2 000 doses ; et cette opération a été suivie immédiatement d'une inoculation cutanée de virus ; pour cela, avec la substance d'un myxome, on a frictionné énergiquement une zone dépilée et scarifiée sur la croupe (cobayes) ou le front (petits ruminants) des animaux ; les sérums recueillis huit, douze, seize, vingt et vingt-sept jours après ne contenaient pas trace d'anticorps déviant le complément.

Dans un deuxième temps, vingt-sept jours après la première inoculation virulente, ces animaux ont reçu par voie hypodermique, les cobayes 150 d. m. m. de virus, et les petits ruminants 300 doses. Leurs sérums recueillis une, deux et trois semaines plus tard n'ont pas révélé de trace d'anticorps.

ETUDE HISTOLOGIQUE.

a) *Examen des testicules* : Il a porté sur les glandes des lièvres de l'Europe Centrale, glandes prélevées neuf jours (lièvre 290), douze jours (289 et 293), quinze jours (290 et 292) et vingt-six jours (289 et 293) après l'inoculation de virus. Aucune lésion spécifique n'a été décelée ; la coupe d'un testicule réséqué quinze jours après l'inoculation (290) offrait une image d'atrophie sclé-

TABLEAU II. — Recherche des anticorps déviant le complément.



reuse imputable à l'âge du sujet ou à un processus chronique d'inflammation.

b) *Examen du myxome frontal (lièvre 292)* : Notre collègue, le Dr J. Levaditi, à la compétence duquel nous devons toute cette étude histologique et que nous remercions de sa grande obligeance, a libellé dans les termes suivants la lecture des coupes de cette lésion : « Tissu scléro-inflammatoire englobant quelques fibres musculaires en voie de dégénérescence vitreuse. Le tissu, d'aspect légèrement granulomateux, avec des vaisseaux, comporte des plages irrégulières tantôt de nécrose cellulaire succédant à une infiltration par des cellules réticulées et des macrophages, qui prennent l'aspect pycnotique, tantôt de collagène en grumeaux épais, irrégulièrement disposés. L'ensemble ne réalise l'aspect ni du fibrome ni du myxome typiques, mais celui de leur bordure granulomateuse. »

RÉSUMÉ ET CONCLUSION.

Nous avons inoculé, par diverses voies, des quantités importantes de virus de Sanarelli à treize lièvres, dont cinq lièvres français, un lièvre d'Alsace et sept lièvres d'Europe Centrale. Les six premiers ont reçu simultanément, mais en des points différents, du virus prélevé sur lapin et du virus prélevé sur un lièvre mort de myxomatose naturellement contractée.

Ces animaux n'ont présenté aucun symptôme de myxomatose. Toutefois, chez l'un d'eux, il s'est formé sous la peau, en l'un des points d'inoculation, un petit nodule virulent dont la structure granulomateuse reproduisait l'image histologique que donne, sur ses bords, le myxome de Sanarelli.

Le virus a été recherché sans succès dans le sang de onze de ces lièvres, du troisième au quinzième jour. Il en a été de même dans la rate, la moelle osseuse, le foie, le rein, le poumon de l'un d'eux qui est mort de coccidiose onze jours après l'inoculation. Mais, chez ce lièvre, à ce moment, du virus subsistait en faible quantité dans ou sous la peau, en l'un des points d'inoculation.

Le virus a été mis en évidence trois fois sur dix, après inoculation testiculaire, dans la substance de testicules réséqués respectivement neuf, douze et quinze jours plus tard.

L'inoculation au lapin des souches isolées du lièvre n'a pas eu de suites donnant à penser que l'agent de la myxomatose s'était modifié en passant par l'organisme du lièvre.

Onze de ces lièvres ont fait l'objet d'examen sérologiques au cours des trois semaines qui ont suivi l'inoculation virulente : un seul a donné une réaction de déviation du complément positive mais faible ; c'est précisément celui chez lequel s'était développé un petit myxome sous-cutané. Le même lièvre et deux autres

auxquels on avait réinjecté du virus un mois après la première inoculation ont donné ultérieurement une réaction de déviation fortement positive.

L'étude histologique des testicules dans lesquels le virus avait été injecté n'a révélé aucune altération spécifique de ces glandes. Au contraire, et nous le rappelons, la lésion frontale dont nous avons fait mention présentait une structure particulière et, dans une certaine mesure, caractéristique.

De l'ensemble de ces constatations, nous croyons pouvoir tirer les conclusions suivantes :

1° Le lièvre est sensible au virus de Sanarelli en ce sens qu'il est capable de répondre à l'inoculation de rappel de ce virus par la formation d'anticorps spécifiques. De ce point de vue, sa sensibilité est très inférieure à celle du lapin, mais elle se distingue nettement de l'indifférence dont témoignent d'autres animaux (cobaye, mouton, chèvre, dans nos essais).

La tolérance des tissus du lièvre, et notamment du parenchyme testiculaire, pour le virus du myxome est également en faveur de cette notion de sensibilité.

2° L'aptitude à élaborer des anticorps doit être, chez le plus grand nombre des individus de l'espèce, la seule manifestation traduisant la réceptivité.

3° Toutefois, chez certains sujets probablement peu nombreux, une lésion sous-cutanée plus ou moins typique, mais néanmoins spécifique, peut se former au point de pénétration du virus.

4° Le virus issu du lièvre ne se montre pas doué, pour le lièvre, d'un pouvoir pathogène plus marqué que celui du virus issu du lapin.

Ces considérations ne doivent pas faire perdre de vue les faits observés l'année dernière en France ; il est incontestable qu'échappant à la règle générale, en vertu d'aptitudes génétiques individuelles ou sous le coup d'influences extérieures particulières, certains lièvres offrent à la myxomatose, dans les conditions naturelles, une vulnérabilité tout à fait comparable à celle de nos lapins.

On notera d'ailleurs que, jusqu'à présent, il n'a été rapporté aucun exemple de lièvre ayant contracté spontanément une myxomatose cliniquement caractérisée qui se soit terminée par la guérison. Compte tenu de ce que, en maintes régions, les chasseurs recherchent et suivent attentivement les lièvres, il est improbable que de tels malades curables aient pu exister en grand nombre et passer inaperçus.

En définitive, bien qu'elle reste inexpiquée, l'opposition flagrante entre la résistance parfaite à la myxomatose-maladie de la plupart des lièvres, et la réceptivité parfaite, elle aussi, de quelques-uns d'entre eux, ne doit pas nous surprendre. Elle est

assimilable et peut-être de même nature qu'elle, à l'opposition, chez les lapins du genre *Oryctolagus*, entre la réceptivité totale, au virus originel, de l'immense majorité des sujets et la résistance, partielle ou totale, de quelque 10 pour 1 000 d'entre eux.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. KESSEL, G. FISK et PROUTY. *Proceed. Fifth Pacific Science Congress*, 1933. University of Toronto Press, édit. 1934, 2930.
- [2] P. MAGALLON et O. et J. BAZIN. *Bull. Acad. vét.*, 1953, **26**, 457.
- [3] H. JACOTOT, A. VALLÉE et B. VIRAT. *Bull. Acad. vét.*, 1953, **26**, 431 : *Ces Annales*, 1954, **86**, 105.
- [4] A. LUCAS, G. BOULEY, C. QUINCHON et L. TOUCAS. *Bull. Off. intern. Epizooties*, 1953, **39**, 770.

REACTIONS DE DIVERS SÉRUMS NORMAUX AVEC DES SUBSTANCES MACROMOLÉCULAIRES NATURELLES OU SYNTHÉTIQUES

par PIERRE GRABAR, avec l'aide technique de M^{lle} J. COGNET (*).

(*Service de Chimie microbienne. Institut Pasteur, Paris.*)

Dans les publications antérieures [1] nous avons émis, et essayé de justifier, l'hypothèse que la formation d'anticorps n'est pas due à un mécanisme spécial de défense, mais que c'est le mécanisme physiologique général de synthèse de globulines qui est responsable aussi bien de la formation des globulines-anticorps que des globulines dites « normales », dont le rôle est de s'unir à diverses substances (provenant du métabolisme ou de la destruction des tissus); elles peuvent ainsi servir de « transporteurs », et même dans certains cas de régulateurs. Nous croyons que cette manière de voir peut faciliter la compréhension ou même l'explication de certains faits ou observations encore mal compris, telles que les relations entre l'allergie et l'immunité, la possibilité de formation d'auto-anticorps, etc.

Au cours d'un travail sur les substituants du plasma sanguin [2], nous avons été amenés à examiner divers sérums normaux et nous avons constaté, grâce à l'emploi d'une méthode très sensible, l'hémagglutination passive ou indirecte, que ces sérums présentent souvent des réactions positives avec diverses substances macromoléculaires, naturelles ou synthétiques. Ces observations nous ont incité à vérifier ces faits sur un plus grand nombre d'échantillons de sérums provenant d'hommes ou d'animaux normaux. Dans ce qui suit nous décrivons les résultats de ces examens (1) et nous discutons la valeur de ces constatations en tant qu'argument en faveur de l'hypothèse mentionnée ci-dessus.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES.

1° SÉRUMS NORMAUX. — Nous avons utilisé des sérums humains ainsi que de rats, de cobayes, de lapins, de bœufs, de chiens

(*) Manuscrit reçu le 23 septembre 1954.

(1) Une partie des résultats de ce travail a été incluse dans un rapport présenté en 1953 au VI^e Congrès Intern. Microbiol. à Rome [3].

et de chevaux. Puisqu'il est impossible de définir un animal « normal », nous avons admis comme sérums normaux, des sérums provenant d'animaux apparemment sains et n'ayant pas reçu, à notre connaissance, d'injections des substances que nous avons étudiées.

Quelques sérums humains nous ont été aimablement fournis par le Dr A. Eyquem, d'autres par le Dr Lewin, du Centre National de Transfusion sanguine.

Nous tenons à remercier, pour la mise à notre disposition de certains sérums de chiens, le Dr vétérinaire Theilleux, du Centre de Transfusion militaire; le Dr vétérinaire Groulade et le Dr J. Jacob, et pour les sérums de chevaux normaux nos collègues de l'Annexe de l'Institut Pasteur de Garches.

Les autres sérums provenaient d'animaux de notre laboratoire ou des abattoirs.

2° SUBSTANCES UTILISÉES. — Diverses substances macromoléculaires ont été utilisées pour la sensibilisation des globules rouges. Il s'agissait de : a) sérumalbumine de cheval purifiée par de nombreuses cristallisations et délipidée à basse température [4]; b) sérumalbumine humaine, préparée par la méthode d'E. Cohn et qui nous a été généreusement offerte par le Dr van Loghem, d'Amsterdam; c) sérumalbumine bovine, préparée par la Maison Armour et Co, de Chicago; d) fractions II et III du sérum de bœuf, de la même maison; e) gélatine commerciale de la Maison Coignet, et une série d'échantillons de gélatines préparées à partir d'os de divers animaux que nous devons à l'amabilité du Dr P. Maurer, de l'Université de Pittsburgh [U. S. A.]; f) des préparations commerciales de dextran; g) subtosan, solution de polyvinylepyrrolidone de la Maison Specia; h) glycogène, soit commercial de la Maison Byla, soit préparé par nous en partant de moules ou de foie de cheval par deux méthodes différentes : par l'acide trichloracétique à froid ou par extraction alcaline à chaud, suivi de purifications par des dialyses, des précipitations à l'alcool, ainsi que par la méthode de Sewag. Les produits employés étaient exempts de (ou très pauvres en) protéides; i) gélose commerciale, purifiée par de nombreux lavages.

3° HÉMAGGLUTINATION PASSIVE OU INDIRECTE. — Dans les expériences exécutées avec des substances de nature protéique, nous avons utilisé des érythrocytes légèrement tannés suivant la méthode de S. V. Boyden [5] et dont les détails techniques ont été décrits dans un travail avec A. G. Borduas [6]. Pour les autres produits nous avons essayé d'utiliser des érythrocytes tannés et des érythrocytes non tannés. Dans ce dernier cas, nous

avons suivi la même technique de sensibilisation que celle qu'on utilise dans la méthode de Middlebrook et Dubos.

Dans tous les cas, les sérums ont été préalablement inactivés à 56° et absorbés par une suspension de globules rouges (G. R.) de mouton lavés. Chaque essai comportait des témoins qui permettaient de contrôler l'absence d'hétéroagglutination ou d'agglutination spontanée des G. R. sensibilisés.

Les quantités de produit nécessaires pour sensibiliser les G. R. ont été choisies aussi petites que possible de manière à rendre la réaction plus sensible et pour éviter l'agglutination spontanée des G. R. après contact avec la substance sensibilisante. Une telle agglutination se produit régulièrement, même avec des quantités minimales de gélose, ce qui nous a empêché d'utiliser des G. R. sensibilisés par ce produit dans nos essais. On observe aussi des agglutinations spontanées de G. R. tannés lorsqu'on les sensibilise avec les fractions II ou III du sérum de bœuf. Cependant, nous sommes arrivés à obtenir des suspensions suffisamment stables en diminuant les quantités de ce produit pour la sensibilisation.

4° INHIBITION DE L'HÉMAGGLUTINATION. — Dans certains cas, et notamment, lorsqu'on veut prouver la spécificité d'une réaction d'hémagglutination passive, il est utile d'effectuer des réactions d'inhibition. Dans ce but, il suffit d'ajouter à des échantillons du sérum à examiner, des quantités croissantes de la substance qui a servi pour sensibiliser les G. R., de laisser ce mélange réagir pendant quelque temps (nous laissons au moins deux heures) et d'employer ensuite ces mélanges parallèlement au sérum initial pour effectuer l'hémagglutination des G. R. sensibilisés. Cette hémagglutination ne se produit pas lorsque la quantité de substance ajoutée au sérum est suffisante pour neutraliser tous les « anticorps » présents.

5° RÉACTIONS DE PRÉCIPITATION. — D'une manière générale les substances employées ne présentent pas de réaction de précipitation franche avec les sérums normaux, à l'exception de la gélose [7] et du glycogène [8] que nous avons étudiés antérieurement. Cependant, certains sérums présentent une trace de réaction du disque (ring-test) avec la gélatine et le dextran, mais ces réactions sont tellement faibles qu'on hésite à les considérer même comme des « traces ». Dans le cas du glycogène, nous avons effectué des réactions de précipitation quantitatives, d'après la méthode générale de Heidelberger et Kendall, en dosant l'azote du précipité et en utilisant généralement plusieurs millilitres de sérum pour augmenter la précision.

II. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

Nous avons groupé dans le tableau I l'ensemble des résultats obtenus avec divers sérums normaux et des G. R. tannés et sensibilisés avec des solutions de *protéines*. Nous n'avons exclu que quelques résultats douteux et les expériences où les témoins n'étaient pas parfaitement négatifs. Les titres indiqués corres-

TABLEAU I. — Réactions de divers sérums normaux avec des globules rouges de mouton tannés et sensibilisés par des protéines.

Sérums de :	Nombre d'échantillons	Nombre de résultats					
		Négatifs	Positifs au				
			1/10	1/50	1/100	1/500	1/1000
<u>I. G.R. sensibilisés avec la gélatine :</u>							
Homme	3	0			2		1
Chien	6	0		1	4		1
Cheval	4	1			2		1
Boeuf	1	0			1		
Lapin	2	1		1			
Rat	2	2					
Poule	1	0	1 ±				
<u>II. G.R. sensibilisés avec la sérumalbumine bovine</u>							
Homme	18	14	4				
Chien	13	7	4		1	1	
Cheval	3	2	1 ±				
Rat	1	1					
<u>III. G.R. sensibilisés avec la sérumalbumine équine</u>							
Chien	9	7	1 ±	1 ±			
<u>IV. G.R. sensibilisés avec la sérumalbumine humaine</u>							
Chien	8	7			1 ±		
<u>V. G.R. sensibilisés avec la γ-globuline bovine</u>							
Homme	8	7	1				
Chien	9	3	2	1	2	1 ±	

pondent à la dilution limite du sérum qui donnait une réaction positive franche ou légèrement positive.

On voit qu'à l'exception du sérum de rat, les autres sérums agglutinent les G. R. tannés et sensibilisés avec de la gélatine (100 μ g par millilitre de G. R. à 2,5 p. 100). La plupart des sérums réagissait encore à la dilution au 1/100 et un sérum de chien même au 1/1 000.

Dans une récente série d'expériences, nous avons comparé les réactions de divers sérums avec les gélatines provenant d'espèces

animales différentes. Le tableau II représente, à titre d'exemple, les résultats obtenus avec un sérum humain et un sérum de chien et huit gélatines différentes. Les autres sérums essayés ont donné parfois des titres très faibles ou nuls (un des sérums de chevaux et un des sérums de lapins normaux). Le seul sérum, qui donnait une réaction négative avec de la gélatine du

TABLEAU II. — Hémagglutination passive des G. R. de mouton sensibilisés avec des gélatines de diverses provenances (*).

Gélatines de:	Sérum humain					Sérum de Chien				
	1/10	1/50	1/100	1/500	Témoins	1/10	1/50	1/100	1/500	Témoins
Cheval	+	+	+	±	-	+	+	+	-	-
Souris	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
Poule	+	+	+	±	-	+	+	+	±	-
Lapin	+	+	±	-	-	+	+	-	-	-
Dindon	+	+	+	±	-	+	+	+	-	-
Agneau	+	+	+	±	-	+	+	+	-	-
Chien	+	+	+	±	-	+	+	±	-	-
Commerciale	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-

(*) 500 µg de gélatine par ml de G. R. à 2,5 p. 100.

commerce et les gélatines de lapin, d'agneau et de chien et positive avec une gélatine préparée à partir d'os provenant de la même espèce, était un sérum de poule, mais le titre était très bas (1/10); cependant ce sérum réagissait aussi, mais encore plus légèrement (±) avec les gélatines de dindon, de souris et de cheval. Dans tous les autres cas, on n'a pas pu mettre en évidence de spécificité d'espèce des diverses gélatines essayées.

Les sérums de chien réagissaient parfois assez fortement avec des G. R. sensibilisés avec des globulines bovines et, à un degré moindre avec la sérumalbumine bovine, tandis qu'ils ne donnaient que rarement des réactions positives avec les sérumalbumines humaine ou équine. Les sérums humains ne donnaient que des réactions faibles ou négatives avec les protéines bovines.

Des réactions positives (tableau III), même à de fortes dilutions, ont été observées dans le cas de G. R. tannés et sensibilisés avec le dextran (100 µg par millilitre de G. R. à 2,5 p. 100). Avec des sérums de chien, de rat et de taureau des résultats

positifs ont été enregistrés même pour les dilutions à 10^5 . Dans les cas du rat et du taureau on a observé un phénomène de zone : la dilution du dixième restait négative tandis que toutes les autres jusqu'à 10^5 étaient positives. Il en était presque de même avec le sérum humain (réaction à peine positive au dixième, puis positive jusqu'à 10^4) et le sérum de cheval (réaction presque négative pour 10^2 , positive à 10^3 et 10^4 , négative à 10^5).

Avec des G. R. tannés et sensibilisés avec le *polyvinylpyrrolidone* (subtosan : 100 μ g par millilitre de G. R. à 2,5 p. 100) les

TABLEAU III. — Réactions de divers sérums normaux avec des G. R. sensibilisés par le subtosan, le dextran et le glycogène.

Sérums de	T i t r e					Témoins
	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	
<u>I. Glycogène</u>						
a) GR non tannés						
Homme	-	-	-	-	-	-
Chien	-	-	-	-	-	-
Rat	-	-	-	-	-	-
b) GR tannés						
Cheval	-	+	+	-	-	-
<u>II. Subtosan</u>						
Chien	+	+	±	-	-	-
Rat	-	+	+	-	-	-
Taureau	+	+	±	-	-	-
Homme	±	±	-	-	-	-
Cheval	±	-	-	-	-	-
<u>III. Dextran</u>						
Chien	+	+	+	+	±	-
Rat	-	+	+	+	+	-
Taureau	-	+	+	+	+	-
Homme	±	+	+	+	-	-
Cheval	±	±	+	+	-	-

résultats les plus forts ont été trouvés pour du sérum de rat, 10^2 , avec un phénomène de zone, le sérum de bœuf, 10^2 , 10^3 , et de chien, 10^2 . Tandis qu'avec des sérums humains des résultats faiblement positifs allant jusqu'à 10^2 ont été observés. Enfin, un sérum de cheval a donné un résultat positif au dixième seulement (tableau III).

Les G. R. tannés et sensibilisés avec du *glycogène* ont été agglutinés par du sérum de cheval dilué à 10^2 et 10^3 .

Aucun des sérums examinés n'a agglutiné des G. R. sensibilisés avec ces divers produits sans tannage préliminaire. Pour le moment nous ne savons pas si ce fait est dû à une absence

de fixation de ces produits sur les G. R. normaux ou à une autre cause.

Les résultats de nos *expériences de précipitation* des sérums normaux par du *glycogène* (2) peuvent être résumés comme suit :

1° Des *épreuves du disque* (ring test) positives ont été observées surtout avec des sérums de chevaux ; presque tous donnent une réaction très nette. Les quelques sérums de poules que nous avons essayés ont donné une réaction positive, tandis que les sérums humains étudiés ne donnaient pas tous des réactions positives ; enfin les sérums de lapins ont donné des réactions très faibles ou négatives.

2° La réaction a été étudiée quantitativement sur trois sérums de chevaux et nous avons trouvé : 4,5 ; 6,5 et 20 μg d'N précipité par millilitre de sérum. Les résultats n'étaient pas très constants, fait qui s'explique par l'observation récente du Dr Heidelberg que cette réaction est très sensible à des variations de température [9]. Pour obtenir ces précipités minimes, on est obligé d'ajouter au sérum des quantités assez importantes de glycogène. Nous avons cherché à doser le glycogène dans les précipités, mais sans succès, car la quantité de glycogène dans le précipité s'est avérée inférieure à la limite de sensibilité de la méthode utilisée (quelques μg). Le précipité serait formé surtout de protéine et ressemble ainsi à un précipité spécifique qui contient plus d'anticorps que d'antigène.

L'ensemble de ces résultats semble indiquer que diverses substances macromoléculaires peuvent donner, avec des constituants de sérums normaux, des réactions identiques à celles qu'on emploie pour démontrer la présence d'anticorps. Des différences notables ont pu être constatées entre les sérums provenant d'espèces différentes et même entre individus de la même espèce.

Pour pouvoir affirmer que les réactions observées sont du même type que les réactions antigène-anticorps, il fallait démontrer qu'elles sont spécifiques.

Dans ce but nous avons effectué des essais d'inhibition de l'hémagglutination. Le tableau IV illustre des expériences de ce genre. On voit ainsi que l'hémagglutination de G. R. sensibilisés avec de la sérumalbumine bovine par le sérum de chien peut être presque totalement inhibée par l'adjonction à ce sérum de 50 μg de sérumalbumine par millilitre de sérum, tandis qu'elle n'est pas inhibée même par 1 mg de gélatine. De même, l'agglutination des

(2) Ces essais ont été brièvement mentionnés dans une communication au I^{er} Congrès International de Biochimie, Cambridge, 1949 [8] ; nos résultats ont été publiés récemment par le professeur Heidelberg [9].

G. R. sensibilisés par de la gélatine est partiellement inhibée par la gélatine, mais non par la sérumbumine. Les résultats obtenus avec le sérum humain sont moins nets, mais grossièrement analogues. D'autres résultats, comme par exemple les titres différents que l'on obtient en utilisant le même sérum et des G. R. sensibilisés avec des sérumbumines d'espèces différentes (tableau I), plaident également en faveur de la spécificité des réactions observées.

L'absence de spécificité d'espèce dans les réactions des divers sérums avec les gélatines provenant d'espèces variées d'animaux signalée plus haut à propos d'essais directs, a été confirmée par des réactions d'inhibition de l'hémagglutination ; pour observer

TABLEAU IV. — Inhibition des réactions de sérums normaux avec la sérumbumine bovine (S.A.B.) et la gélatine (Gél.).

G.R. sensibil. par S.A.B.							G.R. sensibil. par gél.						
Nature et quan- tité d'inhibi- teur ajouté	T i t r e					Témoins	Nature et quan- tité d'inhibi- teur ajouté	T i t r e					Témoins
	10	25	50	75	100			10	25	50	75	100	
<u>I. Sérum humain normal.</u>													
0	+	±	-	-	-	-	0	+	+	+	+	+	-
10γ S.A.B.	-	-	-	-	-	-	10 γ gél.	±	±	±	±	±	-
100γ "	-	-	-	-	-	-	100 "	-	-	-	-	-	-
0	+	±	-	-	-	-	0	+	+	+	+	+	-
10γ gél.	-	-	-	-	-	-	10γ S.A.B.	+	±	-	-	-	-
100γ "	±	-	-	-	-	-	100γ "	+	±	±	-	-	-
<u>II. Sérum chien normal IB.</u>													
	10	50	100	500	1000	Témoins		10	50	100	500	1000	Témoins
0	+	+	+	±	-	-	0	+	+	+	+	+	-
10 γ S.A.B.	+	±	-	-	-	-	10 γ gél.	+	±	±	±	-	-
50 γ "	+	-	-	-	-	-	50 γ "	+	±	-	-	-	-
100γ "	+	±	-	-	-	-	100 γ "	+	±	±	-	-	-
<u>III. Sérum chien normal A.</u>							<u>Sérum chien normal III-1</u>						
0	+	+	±	-	-	-	0	+	+	+	-	-	-
100 γ S.A.B.	±	-	-	-	-	-	5 γ gél.	+	-	-	-	-	-
500 γ "	±	-	-	-	-	-	50 γ "	+	-	-	-	-	-
<u>IV. Sérum chien normal II B</u>													
0	+	+	+	-	-	-	0	+	+	+	-	-	-
500 γ gél.	+	+	-	-	-	-	500 γ S.A.B.	+	+	-	±	-	-
100 γ "	+	+	-	-	-	-	1000 γ "	+	+	-	-	-	-

une inhibition analogue, il fallait ajouter au sérum les mêmes quantités de gélatine d'origine différente. Cette absence de spécificité est probablement due au traitement brutal que subissent les protéines naturelles lors de leur transformation en gélatines, traitement qui peut faire disparaître les groupements spécifiques de l'espèce.

Des essais d'inhibition de l'hémagglutination des G. R. tannés et sensibilisés avec des macromolécules de nature non protéique n'ont pas donné des résultats aussi nets qu'on aurait souhaité. Aussi bien avec le glycogène qu'avec le subtosan et le dextran on arrivait assez facilement à faire baisser le titre (par exemple du millième au centième ou au dixième), mais on n'observait généralement pas d'inhibition complète, même en employant des doses assez élevées du produit (jusqu'à 1 mg de produit par millilitre de sérum). Diverses explications de ce fait pourraient être envisagées. On pourrait, par exemple, penser que seules les molécules de très grande masse moléculaire interviennent dans la réaction, tandis que les échantillons des produits que nous avons utilisés pourraient être relativement pauvres en ces molécules. D'autre part, il faut noter que d'une manière générale les quantités d'antigènes nécessaires pour inhiber une réaction d'hémagglutination passive sont relativement grandes. De plus, nous savons [6] qu'un complexe soluble antigène-anticorps formé en présence d'un excès d'antigène peut encore provoquer l'agglutination de G. R. sensibilisés avec ce même antigène. Il est donc assez logique que pour inhiber une hémagglutination passive il soit nécessaire d'employer un très grand excès d'antigène.

Plusieurs des sérums normaux utilisés ont été fractionnés et nous avons pu nous rendre compte que ce sont les globulines qui renferment les substances actives. Dans le cas du sérum de cheval, c'est la fraction euglobuline (fraction Felton) qui donne la réaction avec le glycogène, la même que celle qu'on peut isoler d'un immunosérum de cheval antipolyosidique (par exemple, antipneumocoques). Enfin, des γ -globulines purifiées de chien ont donné des résultats semblables à ceux que l'on obtient avec le sérum total.

III. — DISCUSSION DES RÉSULTATS.

Nos expériences montrent que des sérums « normaux » renferment des protéines (globulines) qui réagissent avec diverses substances macromoléculaires, comme réagiraient des anticorps envers ces substances. La méthode employée, l'hémagglutination passive, est très sensible. Avec des sérums d'animaux immunisés les taux sont très élevés, allant jusqu'à 10^8 , tandis qu'avec les sérums « normaux », nous ne dépassons généralement pas des taux de 10^2 , rarement 10^3 , ce qui explique probablement que ces réactions n'aient pas déjà été signalées (3). Cependant, plusieurs

(3) Ces taux correspondraient, d'après un calcul approximatif, à 0,05-5 μ g de protéines par millilitre, c'est-à-dire à moins de 0,01 p. 100 des protéines totales du sérum [3].

travaux entrepris dans des buts différents confirment nos résultats. En étudiant les réactions croisées entre des polyosides du pneumocoque et le glycogène, Heidelberger [9] a trouvé que les sérums de chevaux normaux précipitent avec ce dernier; la réaction étant très faible, il a dû, comme nous, utiliser des volumes de sérum assez grands pour doser les « anticorps » par la réaction de précipitation spécifique. Kabat et Berg [10], en étudiant l'antigénicité du dextran pour l'homme, ont trouvé que le sérum des sujets avant toute injection de ce produit donnait avec lui un très faible précipité, à la limite de la sensibilité de la méthode utilisée. De même Maurer observe des traces de précipité en ajoutant de la gélatine à des sérums de sujets normaux, volontaires pour subir ultérieurement des injections de gélatine en vue d'une étude de son antigénicité chez l'homme. En utilisant des volumes relativement grands de ces sérums et en laissant la précipitation se parfaire pendant plusieurs jours, il a pu doser l'N des précipités obtenus (quelques μg par millilitre de sérum), constater que ce sont bien des γ -globulines qui précipitent et que la gélatine est présente dans ces précipités (dosages de l'oxyproline) [11]. Dans tous ces cas les quantités d'N précipité sont du même ordre de grandeur que celles qu'on pourrait calculer en se basant sur les taux que nous trouvons à l'aide de la réaction d'hémagglutination passive et en utilisant les mêmes produits : gélatine, dextran, glycogène.

Comment peut-on interpréter ces observations ? Les réactions entre des polyosides et des protéines ont été classées parfois comme étant dues à la formation de coacervats [12]. Rosenfeld et Plichevskaja [13] admettent la formation de « complexes » entre des glycogènes d'origines différentes et diverses protéines, le spectre d'absorption U. V. de ces derniers étant modifié plus ou moins fortement par l'addition de quantités variables des diverses préparations de glycogènes. La formation de ces complexes serait favorisée par la structure ramifiée des glycogènes et la structure non globulaire des protéines ; ainsi la myosine serait la plus active et, parmi les protéines du plasma, le fibrinogène.

Dans tous les cas où nous avons pu nous rendre compte que les réactions peuvent être qualifiées de « spécifiques », nous croyons avoir le droit d'exclure les hypothèses de réactions provoquées par l'instabilité de certains constituants du sérum qui auraient tendance à s'adsorber sur des G. R. sensibilisés. Les réactions d'inhibition de l'hémagglutination et les taux différents des mêmes sérums envers des G. R. sensibilisés par des produits différents plaident également contre une telle hypothèse, ainsi que contre toute hypothèse qui ne ferait pas intervenir le facteur « spécificité ». C'est pourquoi il nous semble difficile d'assimiler les réactions observées aux cas de la formation de coacervats ; de

plus, on sait que ces derniers ne se forment que dans des limites étroites et caractéristiques de pH, or tous nos essais sont exécutés au pH normal du sérum et des réactions positives sont observées malgré la nature variée des substances employées (4).

Il serait plus délicat de faire une distinction entre une réaction du type « antigène-anticorps » et la formation de « complexes » entre glycogènes et protéines; car si dans ce dernier cas la structure intime des glycogènes et des protéines intervient comme facteur essentiel, ainsi que l'admettent les auteurs russes [13], il n'y a pas beaucoup de différences avec ce que l'on suppose être la cause des réactions entre antigènes et anticorps.

On pourrait, d'autre part, considérer les réactions que nous observons avec les sérums normaux comme étant dus à des « anticorps normaux », en désignant par ce terme les anticorps envers divers microorganismes, qu'on a trouvés depuis longtemps dans les sérums d'hommes ou d'animaux sains et dont la présence peut facilement s'expliquer soit par des infections inapparentes ou anciennes, soit par des réactions croisées avec des constituants analogues de microorganismes non pathogènes, etc. Ainsi on pourrait expliquer par la présence d'anticorps antipneumococciques (ou envers d'autres microorganismes ayant des polysides de constitution voisine) nos réactions avec le glycogène ([9] ou avec le dextran [10]. Mais une telle explication serait difficile à appliquer au cas des protéines.

Pour ces dernières on pourrait faire appel aux observations faites sur les allergiques. On sait en effet qu'on peut mettre en évidence, tout au moins chez certains allergiques [14, 15, 16], la présence dans le sérum d'anticorps donnant une réaction d'hémagglutination positive avec des G. R. sensibilisés avec l'allergène. On pourrait donc supposer que par exemple un chien, en mangeant de la viande de bœuf, s'est sensibilisé envers la sérum-albumine ou la γ -globuline bovine. Le cas de la gélatine pourrait s'expliquer d'une manière analogue pour les carnivores (en admettant éventuellement une réaction croisée, avec d'autres protéines), mais nous avons observé des réactions positives, même chez quelques herbivores.

Nous croyons que ces divers résultats peuvent s'expliquer d'une manière uniforme par l'hypothèse plus générale exposée au début de ce mémoire. Il faudrait toutefois admettre qu'une partie au moins des réactions observées sont du type croisé, les substances que nous avons utilisées n'étant pas les mêmes que celles pour lesquelles il existe normalement des « transporteurs » dans les sérums étudiés. Le cas le plus caractéristique serait la réaction des sérums des herbivores avec la gélatine; elle pourrait

(4) Nous remercions M. D. Dervichian de cette suggestion.

être due à des « globulines-transporteurs » des produits de dégradation de leur propre tissu cartilagineux ou osseux, par exemple.

Le cas du glycogène semble le plus suggestif, et il nous paraît utile de mentionner ici les observations de Genkin [17]. Cet auteur trouve que le glycogène du foie est lié à des globulines, reproduit cette combinaison *in vitro* en utilisant des glycogènes d'animaux différents et des euglobulines (précipitation par CO₂) extraites de foies, et constate que la combinaison se fait d'autant mieux que le glycogène possède une structure ramifiée. Les globulines ayant été extraites de foies non débarrassés du sang qu'ils contiennent, pourraient être, au moins en partie, les mêmes que celles que nous retrouvons dans le sérum circulant. S'il en est ainsi, on pourrait les désigner par « transporteurs de glycogène ».

En ce qui concerne les réactions que nous avons observées avec le subtosan, nous ne possédons pas d'explication valable, cette substance synthétique ne ressemblant, à notre connaissance, à aucun constituant biologique normal. On sait que le dextran et le subtosan provoquent, l'un chez le rat, l'autre chez le chien, non sensibilisés au préalable, des réactions du type allergique [18]. On aurait pu s'attendre à ce que les sérums de ces deux espèces réagissent à des taux spécifiquement différents avec ces deux substances. Pourtant, nos essais faits sur plusieurs animaux de chaque espèce (tableau III), n'ont pas montré de différences significatives. Ainsi, l'existence de réactions *in vitro* entre ces substances et les sérums de divers animaux ne permettent pas d'expliquer le mécanisme de la sensibilité des rats à l'un et des chiens à l'autre de ces produits. Nous pensons, néanmoins, que nos constatations pourraient servir de point de départ pour des essais d'explication [49] des diverses réactions « anaphylactoides » connues (telles qu'on obtient, par exemple, chez le cobaye avec de la gélose, etc.). On peut en effet envisager, comme premier échelon d'une chaîne de manifestations anaphylactiques, les réactions que nous observons *in vitro* entre diverses substances macromoléculaires et des constituants du sérum sanguin.

RÉSUMÉ.

Des substances macromoléculaires naturelles : protéides du sérum sanguin, gélatine, glycogène, dextran, gélose, ou synthétiques, comme la polyvinylpyrrolidone réagissent avec des sérums sanguins d'Homme ou de divers animaux « normaux ». La plupart de ces réactions ne peut être mise en évidence que par des méthodes très sensibles, comme l'agglutination de globules rouges tannés et sensibilisés par la substance étudiée. Il a été possible de prouver, en utilisant des réactions d'inhibition de l'hémagglu-

tion passive, que tout au moins certaines de ces réactions sont spécifiques, dans le sens immunologique de ce terme.

La présence dans les sérums « normaux » de globulines qui donnent les mêmes réactions que les anticorps des immunosérums, bien que, à des taux bien plus bas, peut, à notre avis, apporter des arguments en faveur de notre hypothèse sur l'identité des mécanismes physiologiques de la synthèse des globulines-transporteurs et des globulines-anticorps.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. GRABAR. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1944, **26**, 398. *Les globulines du sérum sanguin*, Désoer, Liège, 1947 ; ces *Annales*, 1950, **79**, 640.
- [2] A. EYQUEM, P. GRABAR et M. PERROT. *Vox Sanguinis*, 1954, **4**, 29.
- [3] P. GRABAR. *C. R. VI^e Congrès Intern. Microb.*, Rome, 1953 (à paraître).
- [4] P. GRABAR. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **112**, 1094.
- [5] S. V. BOYDEN. *J. exp. Med.*, 1951, **93**, 107.
- [6] A. BORDUAS et P. GRABAR. *Ces Annales*, 1953, **84**, 903.
- [7] A. M. STAUB et P. GRABAR. *Ces Annales*, 1943, **69**, 268.
- [8] P. GRABAR. *C. R. I^{er} Congrès Intern. Biochimie*. Cambridge, 1949, p. 446.
- [9] M. HEIDELBERGER, A. C. AISENBERG et W. HASSID. *J. exp. Med.*, 1954, **99**, 343.
- [10] E. A. KABAT et D. BERG. *J. Immunol.*, 1953, **70**, 514.
- [11] P. MAURER. *C. R. VI^e Congrès Intern. Microb.*, 1953, Rome, p. 531 et communication personnelle. Les résultats seront publiés prochainement.
- [12] A. DOBRY. *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 1948, n^o 57, 280.
- [13] E. L. ROSENFELD et E. G. PLICHEVSKAJA. *Biokhimia*, 1954, **19**, 161.
- [14] P. GRABAR, A. BORDUAS et A. HOLTZER. *Acta Allergol.*, 1952, **5**, 30.
- [15] E. S. ORLANS, L. J. RUBINSTEIN et J. R. MARRACK. *Acta Allergol.*, 1953, **6**, 33.
- [16] M. L. GOSSELIN, L. S. MYNORS, R. R. A. COOMBS et F. H. MILNER. *Acta Allergol.*, 1953, **6**, 96.
- [17] A. M. GENKIN. *Biokhimia*, 1953, **18**, 7 ; 1954, **19**, 280.
- [18] M. BRIOT et B. N. HALPERN. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 15. — B. N. HALPERN et M. BRIOT. *C. R. Soc. Biol.*, 1953, **147**, 643.
- [19] M. ROCHA E SILVA. *Rev. canad. Biol.*, 1953, **12**, 325.

CROISSANCE ET TOXINOGENÈSE

(DEUXIÈME MÉMOIRE)

par M. RAYNAUD, A. TURPIN, R. MANGALO et B. BIZZINI (*)
(avec la collaboration technique de RENÉ PÉRY).

(Institut Pasteur. Annexe de Garches.
Service des Anaérobies.)

Dans un mémoire antérieur [1], nous avons décrit les techniques d'étude du rapport entre la croissance bactérienne et la toxinogénèse, et apporté les résultats relatifs au bacille diphtérique. Nous examinerons dans ce deuxième mémoire les cas de *Welchia perfringens*, *Staphylococcus pyogenes*, *Plectridium tetani* et celui de divers *Clostridium* anaérobies.

I. — TOXINE « PERFRINGENS » α (1).

TECHNIQUE. — Nous avons utilisé la souche B. P. 6 K. Les cultures sont entretenues sur milieu Vf. La croissance a été étudiée d'abord en tubes de 14 mm, additionnés d'acide ascorbique neutralisé (1 mg/ml) sans agitation. Les essais de culture en tubes scellés agités n'ayant donné que des résultats irréguliers, nous avons réalisé ensuite l'agitation par barbotage dans la culture d'azote à 5 p. 100 de CO₂, dans un second groupe d'expériences. Le milieu était contenu dans des tubes de 22 × 240 mm ou 40 × 240 mm ; la température était de 35°.

Nous avons employé quatre milieux différents :

- 1° Milieu synthétique de Boyd, Logan et Tytell [2].
- 2° Milieu dérivé du précédent, mais où les amino-acides sont remplacés par 10 g par litre de bacto-casitone Difco.
- 3° Milieu de Adams et Hendee [3] à base de produit de digestion de caséine par le pancréas entier, mais additionné de 1 g de glucose ou de maltose au lieu de dextrine.
- 4° Milieu de Van Heyningen [4].

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 1^{er} juillet 1954.

(1) Les expériences relatives à la toxine *perfringens* ont fait l'objet d'une note préliminaire (1 bis).

La croissance a été mesurée au photomètre Klett-Summerson. Le taux de toxine a été déterminé par diverses techniques :

1° Pouvoir de combinaison à divers niveaux : Le 1/100, Le 1/10, Le 1/1, en utilisant l'émulsion de jaune d'œuf comme indicateur suivant la technique de van Heyningen [4].

Nous avons employé le même sérum pour toute la série de ces expériences. Le niveau de titrage intervient dans la valeur trouvée pour une même toxine, probablement parce que ce sérum est d'avidité assez faible. Nous avons déterminé l'influence du niveau de titrage en titrant une toxine forte (5 Le/ml) avec le même sérum, à différents niveaux :

NIVEAU DE TITRAGE	TITRE LE/ML
L 1/1	5
L 1/4	5
L 1/50	3,3
L 1/100	3,3
L 1/1000	1,25

TABLEAU I.

Milieu	Figure	Taux final de toxine (Le/ml)	Temps de géné- ration (minut)	Culture
Synthétique glucosé	1	0,03-0,10	39	non agitée
"Bacto-Casito- ne" glucosé	2	0,30	16	non agitée
"Pancréas" maltosé	3	1,00	40	agitée
"Pancréas" glucosé	4	1,00	72	non agitée
"Pancréas" glucosé	5	1,33	87	agitée
"Van Heyningen * $\delta = 0,057$	6	2,50	37	agitée
$\delta = 0,127$	7	2,00	39	agitée
$\delta = 0,269$	8	2,00	24	agitée

(*) δ = densité de la semence au temps zéro, exprimée en mg d'azote bactérien par ml.

Pour éviter l'intervention de ce facteur, nous avons ultérieurement effectué tous les titrages avec 0,01 UA (niveau Le/100) en diluant au besoin les toxines fortes de façon appropriée.

2° La D. M. M. a été déterminée sur souris de 20 g. On a injecté par voie intraveineuse 0,5 ml. La durée d'observation était fixée à quatre jours, mais en général les souris qui avaient survécu après vingt-quatre heures, restaient en vie au quatrième jour.

3° L'activité lécithinasique a été titrée par la méthode manométrique de Zamecnick, Brewster et Lipman [5]. Les résultats sont rapportés au tableau I et sur les figures 1 à 8.

DISCUSSION. — On peut constater d'après les figures 1 à 8 que la toxine alpha est sécrétée au cours même de la phase expo-

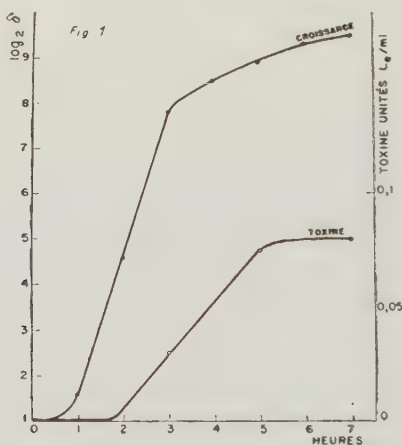


FIG. 1.

nentielle et que le taux de toxine dans le milieu n'augmente pas notablement lorsque la croissance est terminée.

Des résultats analogues ont été obtenus en culture non agitée par Gale et van Heyningen [6] qui ont montré qu'il en était de même pour la toxine thêta.

La toxine n'apparaît pas dans le milieu dès que la croissance exponentielle commence, mais seulement après un temps de latence de soixante minutes qui correspond à une division cellulaire environ. Cette latence ne paraît pas due à un retard de la sécrétion de la toxine par rapport à sa synthèse. S'il en était ainsi, il faudrait, en effet, que la toxine se trouve à concentration assez élevée dans les corps microbiens au cours de la croissance. Or, les diverses techniques d'extraction que nous avons essayées sur les corps microbiens lavés ne nous ont donné que des résultats négatifs. De plus, les corps microbiens lavés ne possèdent aucune

activité lécithinasique. La recherche de cette dernière, par la méthode de Zamecnick et coll., effectuée avec des suspensions de

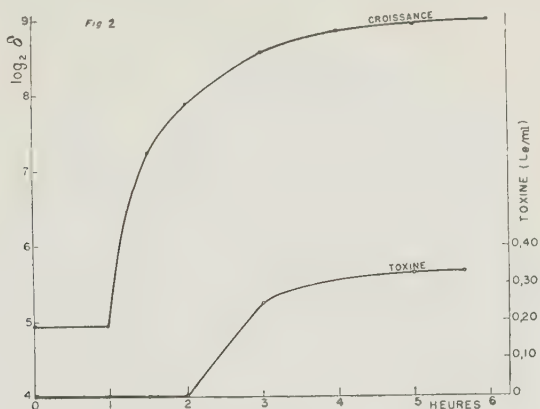


FIG. 2.

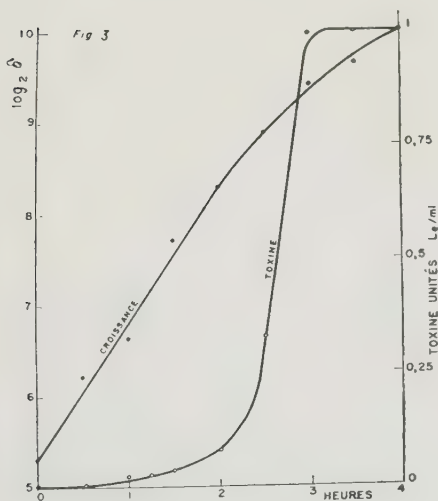


FIG. 3.

corps microbiens prélevés au début de la phase exponentielle ou en fin de culture, est restée négative.

Une fois la synthèse de toxine amorcée, la quantité de toxine formée augmente avec la quantité de germes, mais la relation entre T (toxine) et N (azote bactérien total formé) n'est pas

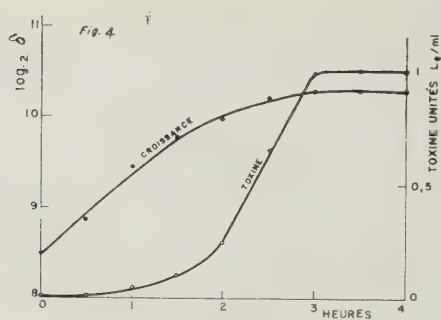


FIG. 4.

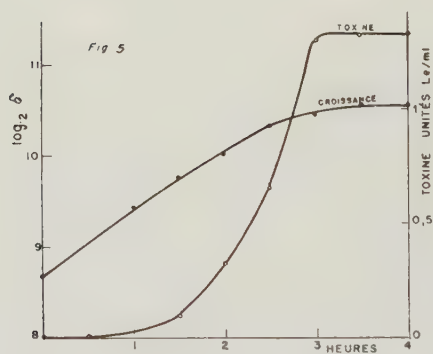


FIG. 5.

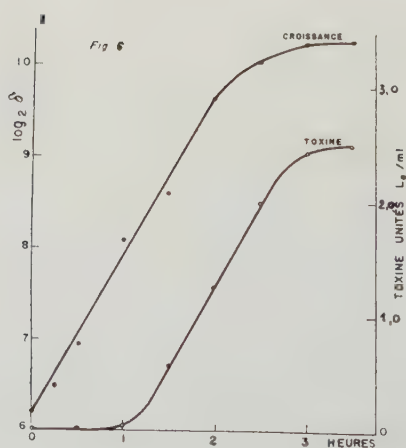


FIG. 6.

simple comme dans le cas de la toxine diphtérique ou de la β -galactosidase d'*E. coli*.

Par ailleurs, la quantité de toxine totale formée dépend aussi de facteurs spéciaux (facteurs de toxinogénèse), qui exercent une action limitante sur la synthèse de la toxine alpha. Les différents

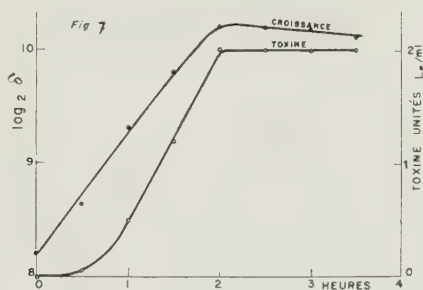


FIG. 7.

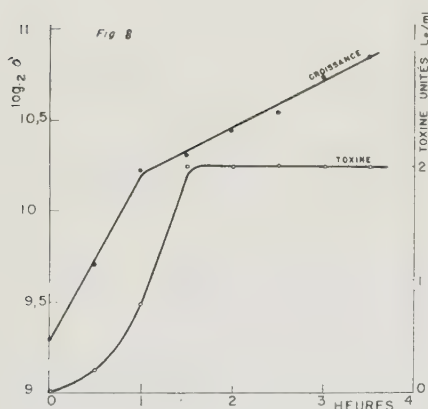


FIG. 8.

milieux que nous avons utilisés contiennent des taux variables de ces facteurs de toxinogénèse indéterminés. Le taux final de toxine dans le milieu est ainsi très variable (de 0,03 Le à 2,5 Le/ml), mais l'évolution de la toxinogénèse n'est pas modifiée pour autant et la courbe de toxinogénèse conserve la même allure générale. L'intervention de ces facteurs de toxinogénèse se fait donc suivant un mécanisme très différent de celui d'un facteur limitant quelconque vis-à-vis de la croissance totale.

La période de latence peut être réduite par augmentation du

volume de la semence. En utilisant des quantités élevées de germes prélevés en phase exponentielle, on peut réduire la phase de latence de la toxinogénèse comme le montrent les figures 7 et 8. Mais la courbe de la toxinogénèse conserve cependant la même allure, le rapport $\Delta T/\Delta N$ n'est pas constant et augmente au cours de la phase exponentielle.

En résumé, la toxine alpha de *W. perfringens* est sécrétée dans le milieu au cours de la phase exponentielle, mais elle n'apparaît qu'après un certain retard, variable avec la densité de la semence.

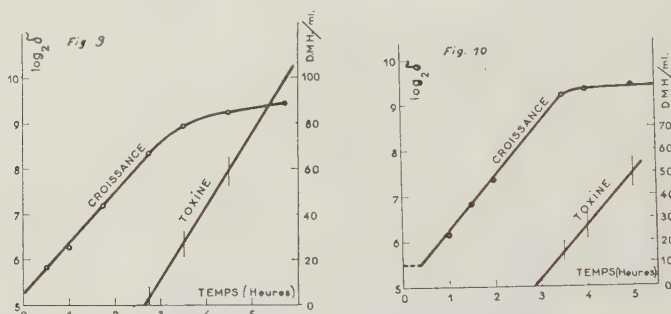


FIG. 9 et 10. — Évolution de la croissance et de la toxinogénèse sur milieu A sous atmosphère d'air à 20 p. 100 de CO_2 (fig. 9) et sous atmosphère d'air sans CO_2 (fig. 10). La culture est faite en ballon tournant. On remarque que pendant les deux premières heures, il n'y a pas dans le milieu de quantité décelable de toxine (moins de 1 à 2 DMH par ml). L'action favorable du CO_2 se manifeste par une vitesse de formation plus grande et un taux final plus élevé. La présence de CO_2 ne diminue pas la durée de la période de latence de la toxinogénèse.

Cette latence ne semble pas due à une rétention endocellulaire, mais elle paraît bien refléter la cinétique réelle de la synthèse de la toxine.

Les processus d'autolyse éventuels qui peuvent suivre la phase de croissance active ne jouent apparemment aucun rôle dans l'évolution de la toxinogénèse dans le milieu.

II. — TOXINE ALPHA DE « STAPHYLOCOCCUS PYOGENES ».

La culture a été effectuée en ballon tournant à l'air libre ou sous courant d'air à 20 p. 100 de CO_2 sur milieu « A » [7]. La souche utilisée était la souche Wood 46. La toxine alpha a été titrée par détermination de la Dose Minima Hémolytique [8] et de la Dose Combinée Hémolytique Lh [9, 10]. Les résultats, qui sont résumés par les figures 9, 10, 11, ont fait l'objet d'une note préliminaire [11].

La toxine n'apparaît dans le milieu qu'après un temps de latence de trois heures environ avec une semence de densité

moyenne. Ce temps de latence peut être réduit à une heure, mais non supprimé par emploi d'un inoculum abondant (fig. 11).

La période de latence n'est pas due apparemment à une rétention endocellulaire de la toxine dans la première phase de la croissance. Les divers essais d'extraction de la toxine à partir des corps microbiens que nous avons effectués par diverses techniques : ultra-sons, action des solutions hypertoniques, auto-

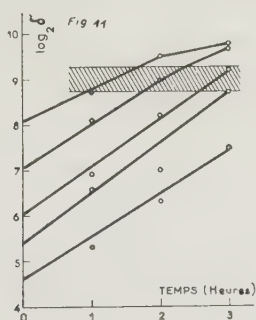


FIG. 11. — Évolution de la croissance sur milieu A dans une série de ballons Erlenmeyer agités, en présence d'air sans CO_2 . La densité bactérienne initiale varie d'un ballon à l'autre. La zone hachurée correspond à la date d'apparition d'un taux décelable de toxine (1 à 2 DMH par ml). On notera que la toxine apparaît d'autant plus tôt dans les cultures que la densité bactérienne initiale est plus élevée. Mais même pour la semence la plus forte ($\delta_0 = 0,075$ mg d'azote bactérien par ml) il persiste une période de latence dans la toxinogénèse.

lyse en présence de pénicilline, agitation mécanique du Mickle-Shaker, etc., sont en effet restés tous négatifs.

III. — TOXINE TÉTANIQUE.

Les cultures ont été effectuées en tubes scellés agités, en sac de cellophane et en bactogène anaérobie. La toxine a été titrée dans le bouillon et dans les extraits de germes par floculation selon la technique de Ramon et par détermination de la D. M. M. sur souris [12].

L'extraction de la toxine a été réalisée par deux techniques :

1° Lyse ménagée à 33° en présence de pénicilline (1 000 unités par millilitre) en eau physiologique [13].

2° Action à 0° pendant cinq jours d'une solution hypertonique (NaCl M/1, citrate trisodique M/10) [14].

Le milieu utilisé a été le bouillon Vf-tétanos [12, 15] et un milieu dérivé du milieu Mueller-Miller n° 3 [16].

1° Culture agitée en tubes scellés :

Le milieu est réparti sous le volume de 7 ml dans des tubes

en verre de 14×240 mm. On ensemece les tubes après régénération et refroidissement avec une suspension dense de germes obtenus par centrifugation d'une culture en ballon Erlenmeyer à 37° . Les germes sont remis en suspension en eau physiologique contenant 10 mg par millilitre de réductose [47].

L'expérience comportait 100 tubes semblables. L'agitation était réalisée dans une machine animée d'un mouvement de bascule au rythme de 30 mouvements par minute.

A intervalles réguliers, la densité optique était lue dans chaque tube directement, la densité optique des tubes stériles ayant été déterminée préalablement.

En même temps, on prélevait 5 tubes au hasard. Après centri-

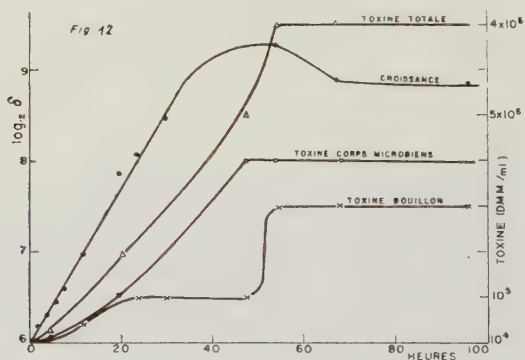


FIG. 12.

fugation, la toxine était titrée dans le liquide surnageant. Les corps microbiens étaient remis en suspension dans un volume d'eau physiologique (additionné de 1 000 unités de pénicilline par millilitre), égal au volume initial de culture (35 ml) et placés à 33° pendant cinq jours. La toxine était alors titrée après élimination des corps microbiens résiduels par centrifugation et filtration sur bougie.

La courbe de croissance reproduite à la figure 12 est donc une courbe statistique. Les valeurs utilisées sont les moyennes géométriques des déterminations faites individuellement sur chaque tube. Le nombre de tubes disponibles diminue au fur et à mesure des prélèvements, si bien que la signification des derniers points est moins élevée que celle des premiers.

Pendant la période de croissance exponentielle qui dure trente heures avec un temps de génération de douze heures, la toxine augmente dans le milieu de culture et dans les corps microbiens. Entre trente et quarante-huit heures, la vitesse de division,

quoique en voie de diminution, n'est pas nulle et la toxine totale augmente toujours ; la sortie de la toxine hors des corps microbiens est très réduite, l'augmentation de la toxine totale étant due surtout à l'augmentation de la fraction endocellulaire. Entre quarante-huit et cinquante-quatre heures, la vitesse de division est pratiquement nulle, mais il n'y a pas de lyse marquée, tout au moins de lyse se manifestant par une baisse de la densité optique de la suspension. C'est pourtant dans cette phase que la sortie de la toxine s'effectue.

Entre cinquante-quatre et cent vingt heures, la densité optique de la suspension baisse, mais reste importante. La toxine totale ne varie pas, non plus que la répartition entre les corps microbiens et le milieu.

Entre cent vingt heures (cinq jours) et deux cent quarante heures (dix jours), il y a une nouvelle baisse assez faible de densité optique. Des processus très complexes doivent alors intervenir, car la toxine totale baisse. La toxine dans le milieu tombe à 10^5 DMM/ml et celle des corps microbiens à 5.10^4 DMM/ml.

Au bout de cinquante-quatre heures, les valeurs obtenues sont les suivantes :

Bouillon	200 000 DMM/ml
Corps microbiens	400 000 DMM/ml
Total, ...	600 000 DMM/ml
Azote bactérien total.	0,240 mg/ml

La valeur du rapport $\Delta T/\Delta N$ (ΔT augmentation du taux de toxine, ΔN augmentation du taux d'azote microbien) varie suivant la période considérée au cours de la croissance.

L'expérience de culture agitée en tubes scellés appelle quelques commentaires :

1° La quantité de toxine contenue dans les corps microbiens est élevée, au moins du même ordre de grandeur que la quantité qui a diffusé dans le milieu de culture et ceci pendant toute la période de croissance active : phase exponentielle et phase de ralentissement. Il est cependant impossible d'affirmer que la quantité de toxine trouvée expérimentalement dans les corps microbiens est vraiment la quantité totale contenue dans les germes. La technique d'extraction employée (lyse en présence de pénicilline à 33°) ne fournit peut-être pas toute la toxine présente dans les germes. La quantité trouvée ne représente donc qu'une limite inférieure de la quantité totale contenue dans les germes. D'autre part, la concentration de la toxine est déterminée en DMM/ml et l'on sait que l'activité de la toxine par UF peut varier de 1 à 1,8, comme le prouvent les résultats de Pillemer [18, 19].

2° En culture agitée en tubes scellés, la croissance active est

finie en cinquante-quatre heures. L'équilibre reste ensuite assez stable jusqu'à quatre-vingt-seize heures. Par la suite, le taux de toxine baisse à la fois dans les corps microbiens et le milieu de culture. Ce phénomène est bien connu et résulte de la destruction progressive de la toxine que l'on observe dans toutes les expériences de toxinogénèse.

	Milieu	DMM/ML Corps microbiens
7 jours	3,10 ⁵	2,10 ⁵
8 jours	3,10 ⁵	10 ⁵
10 jours.	10 ⁵	5,10 ⁴

Nous avons déjà constaté [43] que les germes très âgés ne contiennent que des quantités très faibles de toxine, d'ailleurs beaucoup plus faiblement liée et plus facilement extractible.

Pour obtenir des renseignements plus précis sur les rapports entre croissance exponentielle et toxinogénèse, nous avons alors

TABLEAU II.

	Heures	Croissance		Toxine				T/N		Figures
		Ng/ml	Temps général.	exocellulaire DMM/ml	UF/ml	endocellulaire DMM/ml	UF/ml	totale DMM/ml	UF/ml	
Exp. 1a	0	0,19	—	5.10 ³	0	10 ⁵	0	1,05.10 ⁵	0	13a
	31	1,12	15 h	10 ⁶	110	3.10 ⁶	320	4.10 ⁶	430	
	45	2,54	—	5.10 ⁶	550	2.10 ⁶	200	7.10 ⁶	750	
Exp. 1b	0	1,03	—	8.10 ⁴	0	5.10 ⁵	45	5,8.10 ⁵	45	13b
	31	2,54	15 h	10 ⁶	110	8.10 ⁶	740	9.10 ⁶	850	
	45	3,02	—	2.10 ⁶	200	5.10 ⁶	620	7.10 ⁶	820	
Exp. 2	0	1,94	—	6.10 ⁵	50	2.10 ⁶	220	2,6.10 ⁶	270	13c
	31	3,97	26 h	2.10 ⁶	150	6.10 ⁶	550	8.10 ⁶	700	
	48	7,34	—	8.10 ⁶	850	>10 ⁷	>1000	>18.10 ⁶	>1850	
Exp. 3	0	0,93	—	3.10 ⁵	30	10 ⁶	110	1,3.10 ⁶	140	14
	55	2,20	32 h	8.10 ⁶	850	12.10 ⁶	1350	20.10 ⁶	2200	
	118	9,33	—	15.10 ⁶	1250	20.10 ⁶	1900	35.10 ⁶	3150	

Les résultats sont relatifs au liquide prélevé à l'intérieur du sac. Par centrifugation de ce liquide on obtient : 1° un liquide surnageant (la toxine que l'on y trouve est appelée toxine exocellulaire) ; 2° un culot microbien, qui livre, par extraction par un volume de solution hypertonique égal au volume prélevé, une quantité de toxine que nous appelons toxine endocellulaire.

cherché à obtenir des cultures qui soient toujours en phase exponentielle avec des densités finales microbiennes très élevées, de l'ordre de dix à vingt fois les densités réalisées en récipients clos ordinaires. Si la relation que nous supposons entre croissance et toxinogénèse est bien exacte, on doit ainsi obtenir, dans ces conditions de culture, des concentrations de toxine dix

à vingt fois plus fortes. Ces conditions de culture ont pu être réalisées en adoptant la technique des cultures rapides en sac de cellophane exposée plus haut.

Les expériences 1a, 1b et 2 ont été faites à 35°, avec des semences de densité variable. Dans le tableau II, la densité de la semence est indiquée par la valeur de la suspension de départ à l'intérieur du sac, exprimée en milligrammes d'azote

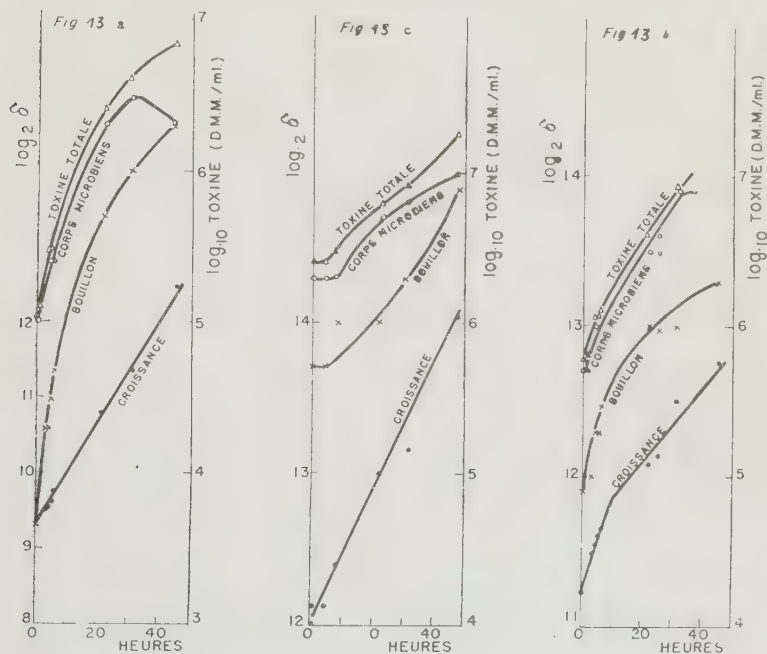


FIG. 13.

bactérien par millilitre. Les expériences 1b et 2 ont été effectuées avec des suspensions très denses. La croissance s'est pourtant poursuivie de façon exponentielle pendant trente à quarante heures.

L'expérience 3 a été effectuée à 28°. On remarquera que les concentrations finales de toxine obtenues sont extrêmement élevées et que la teneur en toxine des corps microbiens prélevés en phase exponentielle est considérable.

La technique de culture continue en sac permet d'obtenir des cultures très abondantes avec une énorme concentration en toxine à des températures relativement basses : 28°.

Le rendement global de la toxine (T/N) [quantité de toxine

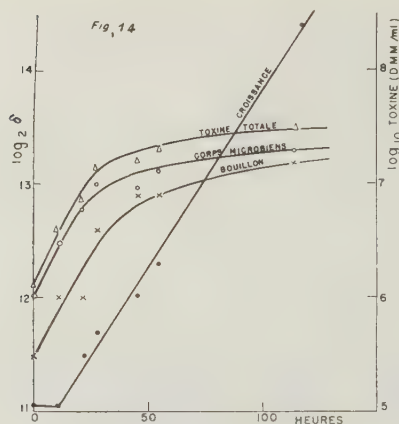


FIG. 14.

TABLEAU III. — Culture rapide en sac de cellophane.
Milieu Fisek, Mueller-Miller.

Heures	Croissance mg N/ml	Toxine					
		Exocellulaire		Endocellulaire		Totale	
		DMM/ml	UF/ml	DMM/ml	UF/ml	DMM/ml	UF/ml
0	0,146	$3 \cdot 10^3$		$2 \cdot 10^4$		$2,3 \cdot 10^4$	
8	0,181	$2 \cdot 10^4$		$5 \cdot 10^4$		$7 \cdot 10^4$	
23	0,276	$4 \cdot 10^4$		10^5		$1,4 \cdot 10^5$	
31	0,345	$5 \cdot 10^4$		10^5		$1,5 \cdot 10^5$	
47	0,518	$6 \cdot 10^4$		$3 \cdot 10^5$	20	$3,6 \cdot 10^5$	20
55	0,648	10^5		$4 \cdot 10^5$	30	$5 \cdot 10^5$	30
71	0,855	$7 \cdot 10^5$	60	$7 \cdot 10^5$	55	$1,4 \cdot 10^6$	115
143	1,360	$5 \cdot 10^6$	55	$2 \cdot 10^6$	185	$7 \cdot 10^6$	240

formée pour la masse bactérienne totale synthétisée] est nettement plus élevée pour les cultures effectuées à basse température (28°). Cette influence favorable, déjà notée empiriquement pour de nombreuses toxines, est ici confirmée grâce à l'emploi de la technique en sac, à la fois au point de vue de la concentration finale qui est plus élevée et du rendement. Le rapport

de l'activité toxique à l'activité floculante est à peu près constant dans toutes ces expériences et voisin de 10 000 DMM/UF. Ce résultat montre que les taux de toxine trouvés sont des taux réels, et qu'il ne s'agit pas d'un phénomène de potentiation.

Par ailleurs, ce rapport est le même pour la toxine trouvée dans le milieu de culture et pour la toxine extraite des corps microbiens. Les résultats d'une série d'expériences sont résumés dans le tableau II et les figures 13 et 14.

Si l'on emploie pour la culture rapide en sac le milieu de Fisek, Mueller et Miller [46], les titres de toxine sont moins élevés, mais la répartition entre toxine endocellulaire et toxine exocellulaire est peu modifiée (tableau III et fig. 17).

D'après les données recueillies en culture agitée et en culture en sac, on peut prévoir qu'en stabilisant une culture continue (bactogène anaérobie) à une densité suffisante ($\delta = 500 = 0,17$ mg N/ml), on obtiendra une production continue de toxine tétanique. Cette prévision a été vérifiée par l'expérience. Les résultats de cette étude seront rapportés ultérieurement.

Discussion. — Les divers résultats ci-dessus permettent de tirer les conclusions suivantes :

1° La toxine tétanique diffuse dans le milieu de culture au cours même de la phase exponentielle de croissance. Cette diffusion ne paraît donc pas liée à une lyse des bactéries.

2° La concentration endocellulaire en équilibre avec la concentration exocellulaire est très élevée.

Nous l'avons exprimée en donnant la concentration que l'on obtient dans le milieu en solubilisant la toxine endocellulaire dans un volume de milieu égal à celui qui contenait la suspension.

Il est évident que le volume réel des cellules n'est qu'une faible fraction de ce volume, utilisé ici pour la commodité des bilans.

Nous avons cherché à obtenir une valeur approchée de la concentration endocellulaire réelle en mesurant le volume des cellules obtenues par centrifugation d'une suspension de densité donnée dans un tube hématocrite. Le volume pour 1 ml d'une suspension à 0,34 mg N bactérien/ml est de 0,01 ml.

On obtient alors en utilisant les chiffres du tableau II les concentrations suivantes (tableau IV) :

Quelles que soient les approximations que comporte une telle estimation, il est bien évident que la concentration endocellulaire réelle est environ cent fois supérieure à la concentration dans le milieu extérieur. Cela signifie que la toxine tétanique ne diffuse

TABLEAU IV.

EXPÉRIENCE	CONCENTRATION	
	Endocellulaire	Exocellulaire
1 a (31 h.)	32 000 UF/ml de vol. cellul.	430 UF/ml
(45 h.)	20 000 — —	750 —
1 b (31 h.)	11 000 — —	740 —
(45 h.)	20 000 — —	620 —
2 (31 h.)	15 000 — —	550 —
(48 h.)	85 000 — —	1 000 —
3 (55 h.)	85 000 — —	1 350 —
(118 h.)	125 000 — —	1 900 —

pas librement hors des corps microbiens et que la sortie hors de la cellule s'effectue sous l'influence d'un gradient de concentration extrêmement élevé, dans une cellule intacte ou après changement de perméabilité de la membrane cellulaire : artificiel (solutions hypertoniques) ou naturel (mort de la cellule).

3° Dans la phase qui suit la phase exponentielle, en culture ordinaire (non agitée, et non en sac), le taux de toxine dans le milieu représente un état final très complexe résultant :

a) De la destruction plus ou moins rapide de la toxine qui a diffusé dans le milieu au cours de la phase exponentielle ;

b) De la sortie hors des corps microbiens de la toxine endocellulaire présente dans ces derniers à la fin de la croissance exponentielle.

Ces résultats nous montrent par ailleurs que les études quantitatives, effectuées sur le rendement en toxine en fonction de divers facteurs (composition du milieu de culture, conditions physiques, souches microbiennes, etc.), doivent être réexaminées en adoptant soit la technique de culture rapide en sac, soit la technique de culture continue anaérobie et en déterminant le taux de toxine endocellulaire et le taux de toxine exocellulaire.

IV. — TOXINES DE DIVERS « CLOSTRIDIUM ». CULTURE RAPIDE EN SAC.

Nous nous sommes proposé d'étudier les rapports entre croissance et toxinogénèse, en même temps que la répartition de la toxine entre le milieu de culture et les corps microbiens pour divers germes anaérobies : *Cl. botulinum* A, *Cl. histolyticum*, *Cl. oedematiens*, *Cl. sordellii*, *Cl. hemolyticum*.

La technique employée est celle de la culture rapide en sac

de cellophane, avec renouvellement du milieu à l'extérieur du sac de façon continue. Le milieu employé dans ces divers cas a été le milieu Vf utilisé pour la préparation de la toxine tétanique [12] glucosé à 8 p. 1 000, sauf dans le cas de *Cl. sordellii* où le même milieu a été utilisé sans addition de sucre. Ce milieu n'est pas adapté spécialement à la production de certaines des toxines considérées. Nous l'avons employé pour de simples raisons de commodité. Nous avons pour chaque germe fait une culture à 35° en Erlenmeyer de 1 l contenant 900 ml de milieu. Cette culture sert de témoin, indiquant la concentration maxima de toxine obtenue avec la souche considérée par la technique classique de culture. L'augmentation notée par emploi de la

TABLEAU V.

Toxine de	Durée de culture à 35°	Taux final de toxine			Temps de génération	Figures
		Culture témoin * Toxine exocellulaire DMM/ml	Culture en sac Toxine exocellulaire DMM/ml	Toxine endocellulaire DMM/ml		
<i>Cl. botulinum</i> A	44 h	10 ⁵	7.10 ⁵	10 ⁶	5 h	15
<i>Cl. histolyticum</i>	21 h	50	700	200	8 h	15
<i>Cl. sordellii</i>	21 h	500	5000	5000	4 h	16
<i>Cl. hemolyticum</i>	46 h	20	200	50	3 h	16
<i>Cl. oedematiens</i>	48 h	20	200	300	6 h	16

(*) Culture en Erlenmeyer à 35°.

technique de culture en sac est donc bien à porter au bénéfice de cette dernière.

La toxine dans ces expériences a été mesurée par détermination de la DMM chez la souris de 20 g par la voie sous-cutanée ou intraveineuse appropriée dans chaque cas. Les résultats sont rapportés au tableau V et sur les figures 15 et 16.

CONCLUSION. — Pour tous ces germes anaérobies, la culture rapide en sac avec renouvellement du milieu permet d'augmenter la concentration de toxine. On peut obtenir une concentration de dix à vingt fois supérieure à celle que l'on réalise avec la même souche et le même milieu en culture ordinaire.

Cette augmentation est liée simplement à l'augmentation de la densité bactérienne en phase exponentielle. Elle peut être obtenue dans des délais assez courts si l'on emploie des semences de densité élevée. Il est facile sur ces cultures très

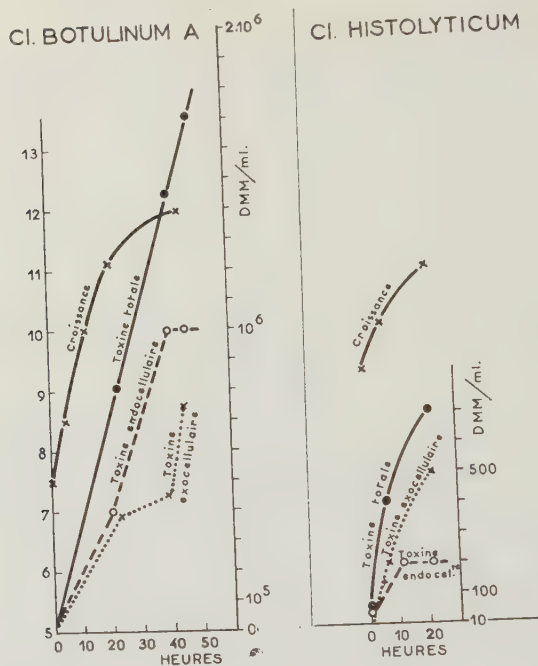


FIG. 13.

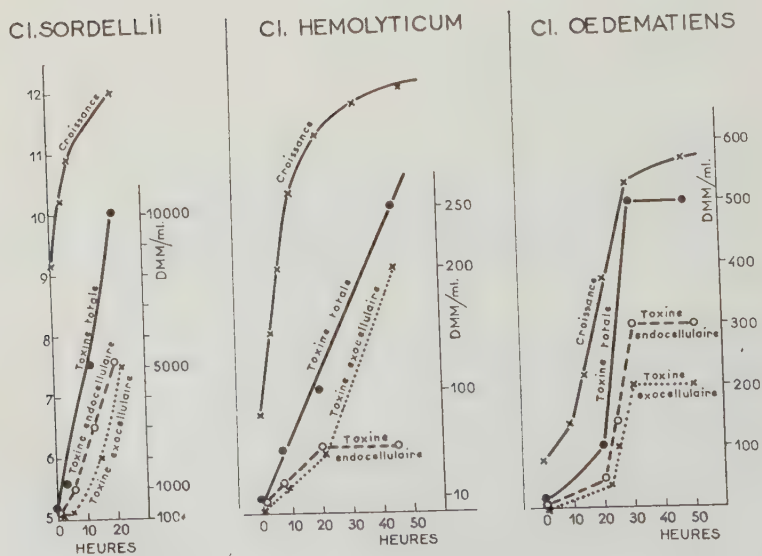


FIG. 14.

denses, prélevées en phase exponentielle, de mettre en évidence la toxine dans les corps microbiens. On peut voir, d'après les résultats que nous avons exposés, que la quantité de toxine présente dans les corps microbiens ainsi cultivés est élevée. Elle représente souvent une quantité totale égale à celle que l'on trouve dans le milieu extérieur. Etant donné ces valeurs très

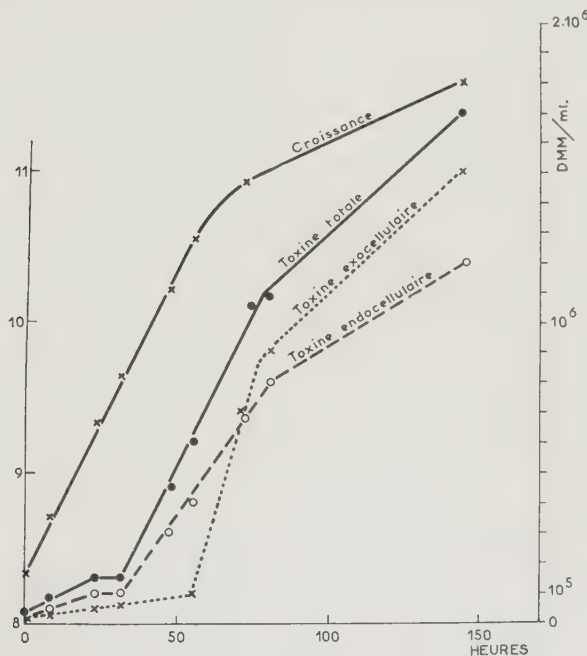


FIG. 17.

élevées, le phénomène ne prête plus à discussion et la présence de la toxine dans les corps microbiens nous semble, pour ces germes, bien établie.

RÉSUMÉ. CONCLUSION.

Les toxines protéiques peuvent être classées en trois groupes :

1° Toxines fortement liées aux corps microbiens. Ces toxines ne diffusent jamais dans le milieu au cours de la phase exponentielle de croissance et doivent être en général extraites des corps microbiens. La neurotoxine *Shiga* et probablement la toxine de *Pasteurella pestis* appartiennent à ce type.

2° Toxines diffusant librement hors de la cellule au cours de la phase exponentielle. La concentration endocellulaire vraie n'est pas nulle, mais faible, probablement du même ordre de grandeur que la concentration exocellulaire. La quantité totale de toxine endocellulaire est négligeable, représentant moins de 1 p. 100 de la quantité totale de toxine exocellulaire. Nous avons étudié trois toxines qui correspondent à ce type : diphtérique, staphylococcique α , *perfringens* α . La toxine apparaît dans le milieu, soit dès que la croissance commence (toxine diphtérique), soit avec un retard appréciable sur le début de la croissance (toxines staphylococcique et *perfringens*).

3° Toxines diffusant plus ou moins dans le milieu de culture, la concentration endocellulaire étant très élevée au cours de la phase exponentielle. La quantité totale de toxine endocellulaire est, soit plus élevée, soit du même ordre de grandeur que la quantité totale de toxine exocellulaire. L'étude expérimentale de la répartition de la toxine entre les corps microbiens et le milieu de culture est facilitée par emploi de la culture continue anaérobie ou de la culture rapide en sac de cellophane. Nous avons trouvé que les toxines des germes suivants appartiennent à ce type : *Pl. tetani*, *Cl. botulinum* (A, D), *Cl. histolyticum*, *Cl. sordellii*, *Cl. hemolyticum*, *Cl. œdematiens*.

D'autres toxines importantes restent à étudier du point de vue nouveau que nous présentons ici.

Notre espoir est que ce travail suscite d'autres recherches dans ce domaine.

BIBLIOGRAPHIE.

- [1] M. RAYNAUD, A. TURPIN, R. MANGALO et B. BIZZINI. Ces *Annales*, 1954, **87**, 599.
- [1 bis] B. BIZZINI, M. RAYNAUD. *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **239**, 122.
- [2] M. J. BOYD, M. A. LOGAN et A. A. TYTELL. *J. biol. Chem.*, 1948, **174**, 1013.
- [3] M. H. ADAMS et E. D. HENDEE. *J. Immunol.*, 1945, **51**, 249.
- [4] W. E. van HEYNINGEN. *Biochem. J.*, 1948, **42**, 127.
- [5] P. C. ZAMECNICK, L. E. BREWSTER et F. LIPMANN. *J. exp. Med.*, 1947, **85**, 381.
- [6] E. F. GALE et W. E. van HEYNINGEN. *Biochem. J.*, 1942, **36**, 624.
- [7] J. PILLET, P. MERCIER et B. ORTA. Ces *Annales*, 1951, **84**, 224.
- [8] A. TURPIN, E. H. RELYVELD, J. PILLET et M. RAYNAUD. Ces *Annales*, 1954, **87**, 185.
- [9] C. E. DOLMAN et J. S. KITCHING. *J. Path. Bact.*, 1935, **41**, 137.
- [10] P. NELIS. *Rev. Immunol.*, 1935, **1**, 152.
- [11] R. MANGALO, J. PILLET et M. RAYNAUD. *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **238**, 1031.
- [12] A. TURPIN, M. RAYNAUD et M. ROUYER. Ces *Annales*, 1952, **82**, 299.

- [13] M. RAYNAUD, R. SAISSAC, A. TURPIN et M. ROUYER. *Ces Annales*, 1952, **83**, 693.
- [14] M. RAYNAUD. *Ces Annales*, 1951, **80**, 356.
- [15] A. R. PRÉVOT et H. G. BOORSMA. *Ces Annales*, 1939, **63**, 600.
- [16] N. H. FISEK, J. H. MUELLER et P. A. MILLER. *J. Bact.*, 1954, **67**, 329.
- [17] A. R. PRÉVOT et M. MOUREAU. *Ann. biol. clin.*, 1949, **7**, 353.
- [18] L. PILLEMER, R. G. WITTNER et D. B. GROSSBERG. *Science*, 1946, **103**, 615.
- [19] L. PILLEMER, R. G. WITTNER, J. I. BURREL et D. B. GROSSBERG. *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 205.

NOTES SUR QUELQUES PROPRIÉTÉS DES TOXINES ENGENDRÉES PAR DIFFÉRENTS TYPES DE *CL. BOTULINUM*

par MAYLIS GUILLAUMIE, A. KRÉGUER et M. GEOFFROY (*).

(*Institut Pasteur.*)

La plupart des traités de bactériologie mentionnent qu'une zone claire d'hémolyse entoure les colonies de *Cl. botulinum* A ou B qui se forment lorsque ces germes poussent sur gélose au sang incubée dans des conditions d'anaérobiose.

Wheeler et Humphreys [1], Schoenholz [2] ont signalé l'aspect irrégulier de ces colonies.

En 1924, Schoenholz [3] a souvent réussi à préparer en milieu liquide des cultures hémolytiques de *Cl. botulinum* A et B ; de ses recherches il ressort que la substance hémolytique élaborée par certaines souches apparaît pendant les premières phases du développement microbien et perd ensuite rapidement son activité à l'étuve. D'après cet auteur, l'hémolysine des cultures botuliques A et B s'affaiblit graduellement à la température ambiante ; elle est détruite en dix minutes à 60°.

Schoenholz et Meyer [4] exposent à la température de 20°, à l'action de la lumière diffuse et à l'air, des toxines *botulinum* A et B préparées en milieu liquide : leurs titrages *in vivo* montrent que la nocivité des toxines subit dans ces conditions une diminution lente et progressive ; les auteurs précisent que l'air accélère la destruction du poison.

Lamana et Lowenthal [5] signalent en 1951 que l'hémagglutinine de la toxine *botulinum* A purifiée et cristallisée est neutralisée non seulement par les sérums anti-*botulinum* A, mais encore par les sérums anti-*botulinum* B ; inversement, l'hémagglutinine de la toxine *botulinum* B est neutralisée par les sérums anti-*botulinum* A. Ainsi qu'on le sait, l'action létale de la toxine *botulinum* A n'est pas supprimée par le sérum anti-*botulinum* B.

Cl. botulinum C et D. — Avant de résumer les travaux parus sur les propriétés des toxines botuliques C et D, il est nécessaire de rappeler quelques faits concernant les dénominations utilisées dans divers articles.

La souche W isolée en Belgique par Willems [6] a été primitivement considérée comme appartenant au type D des *Cl. botulinum* ; Prévot et ses collaborateurs n'ont pas toujours classé selon la nomenclature internationale les souches de *Cl. botulinum* C et D qu'ils ont étudiées ; il en est par suite résulté, pendant un certain temps, une confusion

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 octobre 1954.

dans l'attribution des propriétés propres aux toxines et antitoxines botuliques C et D. Par exemple, Prévot et ses collaborateurs signalent, dans leurs articles publiés en France avant juillet 1953 [7, 8, 9, 10, 11], que la souche française 468 appartient au type D des *Cl. botulinum*, et, par conséquent, appellent toxine *botulinum* D le filtrat des cultures préparées avec cette souche. D'autre part, convaincus du bien-fondé des considérations qu'ils ont formulées en 1950 [10], ils n'hésitent pas en 1953 [11] à désigner par la lettre C la toxine de la souche africaine D6 F alors que partout ailleurs cette toxine est considérée comme étant du type D.

Il est à présent unanimement admis que la souche belge W de Willems et la souche française 468 de Prévot et Brygoo correspondent au type C des *Cl. botulinum* étudiés depuis longtemps en Amérique et dans d'autres pays, car Prévot [12] a définitivement renoncé à ses appellations avant l'ouverture officielle du VI^e Congrès International de Microbiologie qui a eu lieu à Rome du 6 au 12 septembre 1953 [13]. Dans un mémoire donné à l'impression avant ce Congrès, Prévot annonce en effet, avec Brygoo, qu'il adopte désormais la nomenclature américaine, donc la nomenclature internationale; aussi ces auteurs placent maintenant, comme il se doit, les souches W et 468 dans le type C des *Cl. botulinum* et ils appellent : 1^o toxine *botulinum* C la toxine complexe préparée avec ces deux souches; 2^o toxine *botulinum* D la toxine de la souche D6 F; 3^o sérum anti-*botulinum* C le sérum des chevaux préparés contre les antigènes des souches W et 468; 4^o sérum anti-*botulinum* D, le sérum des chevaux immunisés contre la souche D6 F; Prévot et Brygoo ayant signalé dans cet article [12] que leurs premières publications devaient être rectifiées dans ce sens afin que l'unification des nomenclatures soit chose faite, nous résumerons les résultats de leurs premiers travaux [7, 8, 9, 10, 11] en tenant compte de ce fait.

De l'article de Prévot et Brygoo [12] et d'une note de Prévot (*Bull. Acad. vétér. France*, 1953, 26, 421), il ne faut pas déduire que la nomenclature américaine n'est utilisée dans les textes français que depuis les échanges de vues provoqués par le VI^e Congrès International de Microbiologie. Une telle déduction serait erronée. Dans les publications que nous avons faites en 1950 [14] et en 1951 [15] sur les toxines botuliques C et D, nous avons toujours fait usage de la nomenclature américaine; nous l'avons incidemment précisé l'an dernier (*Bull. Acad. vétér. France*, 1953, 26, 422).

Après ce préambule indispensable, citons les notions publiées à propos de l'action exercée par les toxines botuliques, d'une part, sur le sérum humain (SH) ou les émulsions de jaune d'œuf (LV), d'autre part, sur les globules rouges.

En 1942, les filtrats des cultures préparées par Crook [16] avec une souche de *Cl. botulinum* ne troublent ni SH ni LV.

En 1950, Prévot et Brygoo mentionnent notamment : l'hémolysine présente dans la toxine *botulinum* C produite par la souche 468 est neutralisée par les sérums anti-*botulinum* anti-A, anti-B, anti-C et anti-*perfringens*. Cette hémolysine trouble le sérum humain et l'ovolé-

cithine. Cette action est inhibée par les sérums anti-*botulinum* C et anti-*perfringens* ; c'est donc une lécithinase immunologiquement parente du facteur α de *W. perfringens* [7].

Dans un article paru deux mois après celui de Prévot et Brygoo, Guillaumie et Kréguer [14 a] notent que les toxines *botulinum* C faites avec une souche de I. Bengtson (1) et avec la souche CN 2749 de C. L. Oakley contiennent une *hémolysine oxydable*. Ces toxines, lorsqu'elles sont conservées à la température de 2° dans des tubes bouchés au coton, perdent en vingt-quatre à quarante-huit heures, 80 à 92 p. 100 de leur activité ; elles sont réactivables par un réducteur (cystéine). L'effet hémolytique des toxines atténuées n'est pas neutralisable par l'antitoxine *perfringens* α .

Au cours d'une épreuve sérologique réalisée avec un sérum anti-*perfringens* A contenant les antitoxines α et θ et avec un sérum antitétanique très anti-hémolytique vis-à-vis de diverses hémolysines oxydables, Guillaumie et Kréguer [14 a] constatent que ces immunsérums ne manifestent pas à l'égard de la première toxine faite avec la souche I. Bengtson un pouvoir inhibiteur supérieur à celui des sérums normaux (il fallait en effet au moins 0,1 ml de sérum pour neutraliser 11 DMh de cette toxine). Mais l'action hémolytique de toutes les préparations faites ultérieurement avec la même souche a été totalement supprimée par des doses minimes de sérums anti-*perfringens* pauvres en antitoxine α mais riches en anti-hémolysine θ , ainsi que par des doses très faibles de sérums variés qui titraient moins d'une unité anti-*perfringens* α mais contenaient à un taux élevé l'anticorps d'une hémolysine oxydable : sérums anti-tétaniques, anti-histolytiques [14 a] et anti-*sordellii* [14 b, c] ; par exemple, 17 DMh de l'une de ces préparations étaient neutralisées par 0,0001 ml de sérums anti-tétanique et anti-histolytique (2). Au cours de ces recherches, l'effet hémolytique des toxines a été déterminé comme nous le notons plus loin.

Peu de temps après, Brygoo [8] publie les résultats suivants : 1° l'activité hémolytique des toxines fraîchement préparées avec les souches 468 et W n'est pas modifiée par le calcium ; elle est augmentée par l'hydrosulfite Na ; 2° la perte du pouvoir hémolytique, à la température du laboratoire, est d'environ 50 p. 100 en un mois ; l'hydro-

(1) Souche non numérotée donnée à M. Weinberg en avril 1938. Nous avons signalé en 1951 que l'action létale de la toxine préparée avec cette souche est neutralisée par des doses spécifiques de *sérum étalon américain anti-botulinum C* [15].

(2) Le pouvoir anti-hémolytique des sérums est recherché ainsi : dans des tubes de 11 x 120 mm, nous mettons une quantité fixe de toxine (la dose d'épreuve choisie), des volumes décroissants de sérum ; nous complétons à 0,9 ml avec de l'eau physiologique ; les tubes sont placés pendant quarante-cinq minutes à 37° ; nous ajoutons 0,1 ml d'une suspension à 5 p. 100 d'hématies lavées de mouton ; les tubes sont ensuite laissés quatre heures à 37° puis pendant la nuit à 2°. Nous regardons dans quels tubes 50 p. 100 environ des globules sont hémolysés ; si ces tubes contiennent, par exemple, 0,1 ml de sérum dilué à 1 p. 1 000, nous notons qu'il faut 1/10 000 de millilitre de sérum pour neutraliser la dose d'épreuve de toxine. Dans les tubes contenant un volume légèrement plus faible de sérum, l'hémolyse est totale.

sulfite Na intensifie l'activité de l'hémolysine atténuée, mais ce n'est pas à proprement parler une régénération puisque l'action de la solution réductrice se manifeste autant, sinon plus, sur l'hémolysine fraîche ; 3° l'hémolysine de ces toxines résiste à l'action de l'eau oxygénée ; 4° après trois heures de contact, les sérums anti-botulinum A, B, C, anti-perfringens et les sérums normaux de cheval inhibent complètement l'hémolysine jusqu'à la dilution de 1/1 000 et partiellement au taux de 1/2 500. Mais si les globules rouges sont immédiatement ajoutés au mélange sérum + hémolysine, l'hémolyse se produit partiellement pour une dilution de 1/20 et totalement au 1/100. D'après Brygoo, tout se passe comme s'il y avait une action de masse au cours d'une réaction chimique et concurrence entre le sérum et les globules rouges.

Résumant les propriétés des toxines préparées avec les souches 468 et W, Prévot et Brygoo signalent ensuite ensemble [9] que l'hémolysine de la toxine botulinum C est peu ou pas oxydable mais activable par l'hydrosulfite Na, que la réaction de Nagler qu'elle présente est inhibée aussi bien par les sérums normaux que par les sérums anti-botulinum C et anti-perfringens ; qu'il s'agit donc d'une lécithinase du même groupe antigénique que le facteur α du genre *Welchia*.

Ultérieurement, Prévot, Huet et Tardieux [40] utilisent une toxine élaborée par la souche D d'Afrique du Sud et une toxine C africaine pour titrer *in vivo* le sérum d'un cheval immunisé contre la souche 468 ; d'après eux, ce sérum se caractérise par une absence totale de pouvoir antitoxique anti-D alors qu'il neutralise complètement 100 DMh de la toxine C africaine à la dose de 1/2 000 de millilitre. Les auteurs n'indiquent pas la quantité de toxine D ajoutée au sérum anti-C examiné ni la dose de sérum employée au cours du titrage.

Pendant que Prévot et ses collaborateurs réalisaient ces recherches, nous poursuivions l'examen des souches botuliques américaines, anglaises et belge que nous possédions : l'activité hémolytique très marquée et l'oxydabilité très prononcée des toxines que nous faisons nous paraissaient intéressantes ; nous avons relaté nos observations dans une courte note parue en 1951 [45] ; Prévot en a fait une brève analyse dans le *Bulletin de l'Institut Pasteur* (1952, 50, 1172). Parmi les résultats que nous avons alors signalés sur les propriétés de la toxine botulinum C, nous citerons seulement ceux-ci :

a) Trois souches de *Cl. botulinum* C (souche I. Bengtson, souche CN 2749, souche W) fournissent seize à vingt-deux heures après l'ensemencement de différents bouillons des toxines très hémolytiques (jusqu'à 5 000 DMh par millilitre) ; la cystéine ne renforce pas l'effet hémolytique de ces jeunes préparations.

b) L'eau oxygénée affaiblit les propriétés hémolytiques de la toxine botulinum C. Ainsi, une toxine faite avec la souche W perd en deux heures à 37°, en présence de 1 p. 1 000 d' H_2O_2 à 110 volumes, 97,5 p. 100 de son effet hémolytique. La cystéine restaure l'efficacité d'une quantité notable de l'hémolysine botulique oxydée dans ces conditions. Exemple numérique : DMh avant addition de H_2O_2 , 0,002 ml ; après addition de 1 p. 1 000 de H_2O_2 à 110 volumes, 0,08 ml ; après addition de 1 p. 1 000 de cystéine à cette toxine traitée par H_2O_2 , 0,006 ml.

c) A la température de 37°, la toxine *botulinum* C perd plus rapidement la propriété de lyser les hématies de mouton que celle d'opacifier une émulsion LV.

Au sujet de la toxine de *Cl. botulinum* D, nous avons indiqué ceci en 1950-1951 : 1° les premières préparations de toxine *botulinum* D faites en bouillon Vf avec la souche CN 2748 ne lysent pas les hématies de mouton [14 a] ; mais après plusieurs repiquages dans du bouillon Vf glucosé, cette souche élabore une hémolysine oxydable. Pendant la conservation à 2°, au contact de l'air, différentes cultures centrifugées perdent toute activité hémolytique en huit jours ; la cystéine rétablit une partie de leur activité initiale. 2° En présence de 1 p. 100 d'eau oxygénée à 50 volumes, la toxine botulique D fraîchement préparée perd à 37° la presque totalité de son effet hémolytique en deux heures. L'action hémolytique de la toxine D est inhibée *in vitro* par des doses minimes de sérum anti-*perfringens* riche en anti-hémolysine θ ; elle n'est pas neutralisée par de faibles quantités d'antitoxine *perfringens* α . 3° La toxine *botulinum* D trouble l'émulsion de jaune d'œuf ; l'agent responsable de cette action est distinct de l'hémolysine oxydable. 4° *Vingt DMm de toxine botulinum D* préparée avec la souche CN 2748 sont neutralisées par 0,2 ml de sérum anti-*botulinum* C fourni par un cheval hyperimmunisé contre les antigènes de la souche 468 ; à la dose de 0,002 ml, ce sérum supprime l'action létale de 20 DMm de toxine *botulinum* C préparée avec la souche I. Bengtson ; à la dose de 0,0005 ml, il neutralise au moins 10 DMm de toxine *botulinum* C engendrée par la souche anglaise. Ce sérum neutralise très efficacement l'hémolysine θ [15].

L'efficacité anti-*botulinum* D très nette du sérum qui nous a permis d'obtenir ces résultats montre que la toxine D de la souche anglaise employée dans nos essais et la toxine C ayant servi à immuniser le cheval producteur de ce sérum possèdent un antigène létal commun ; ce fait généralise l'opinion de Mason et Robinson [17] sur l'existence d'une communauté antigénique entre les toxines botuliques C et D.

Boroff, Raynaud et Prévot notent brièvement [18 a] que l'antitoxine *botulinum* D ne neutralise pas la toxine préparée avec la souche française de *Cl. botulinum* C : souche déclarée de type C par les investigateurs de l'Afrique du Sud.

En 1953, Prévot et Brygoo [11] signalent leurs essais de neutralisations croisées : leurs titrages attestent que 4 sérums de chevaux immunisés avec la toxine *botulinum* C élaborée par la souche 468 neutralisent un nombre important de doses mortelles de toxine botulique D préparée avec la souche africaine D6 F. Voici, par exemple, les résultats obtenus par ces auteurs avec le sérum 650 dont le titre anti-C est de 300 unités antitoxiques (UA) par millilitre ; 100 UA de ce sérum, c'est-à-dire 0,33 ml, neutralisant 40 DMm d'une toxine D préparée avec la souche D6 F : cet immunosérum est donc analogue, dans ses propriétés essentielles, à celui que nous avons fait agir sur 20 DMm de la toxine D que nous avons préparée avec une souche anglaise ; on peut ainsi penser qu'il existe une similitude entre la souche anglaise de *Cl. botulinum* D avec laquelle nous avons expérimenté et la souche D6 F africaine.

Dans un article sur l'unification de la nomenclature des 5 types

toxigènes de *Cl. botulinum* (*Intern. Bull. Bact. Nom. a. Taxon.*, juin 1953, 3, 120), Prévot mentionne que J. B. Gunnisson distingue dans le type C les sous-types C_a et C_β.

D'après Janet B. Gunnisson [48], la souche 468 semble proche du type C_β primitivement isolé par Seddon sans lui être cependant identique.

Lamana et Jensen [49] ont constaté que l'hémagglutinine de la toxine *botulinum* C est inhibée par les sérums anti-*botulinum* C mais non par les sérums anti-*botulinum* A et B.

M. Sterne [20] a mis en évidence que l'hémagglutination des globules rouges par les filtrats botuliques D est inhibée par les sérums anti-*botulinum* C et D employés à faible dose et par de fortes doses de sérum anti-*perfringens* et anti-*œdematiens*. L'auteur a obtenu ces résultats en expérimentant avec un sérum anti-*botulinum* C qui ne neutralisait pas la nocivité de la toxine *botulinum* D et avec un sérum anti-*botulinum* D incapable de supprimer la nocivité de la toxine *botulinum* C, ce qui montre que l'hémagglutinine des filtrats étudiés est distincte de la toxine létale qu'ils contiennent.

D'après Katitch [24], toutes les souches de *Cl. botulinum* des types C et D ne produisent pas d'hémagglutinine.

Nous n'avons pas recherché si les souches botuliques que nous employons sont capables d'agglutiner les hématies. Nous les avons seulement examinées du point de vue de leurs propriétés hémolytiques et de leur action sur le sérum humain ou sur les émulsions salines de jaune d'œuf frais de poule. En déterminant les doses de divers sérums qui inhibent la réaction de Nagler produite par les toxines botuliniques A, B et C préparées en sacs de cellophane, nous nous sommes rendu compte que le pouvoir inhibiteur des sérums était indépendant de leur richesse en antitoxine *perfringens a*; cette observation est exposée dans l'article suivant; elle montre qu'une substance qui permet à nos préparations de toxine botulique de troubler l'émulsion de jaune d'œuf n'est pas immunologiquement comparable à la lécithinase *perfringens a*.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES.

Pour préparer un toxine botulique quelconque, nous utilisons comme *milieu nutritif* du bouillon Vf ajusté à pH 7,65 et glucosé à 2 p. 1 000 avant la stérilisation à 110° pendant vingt-cinq minutes. Dans quelques cas, nous ajoutons à ce milieu 5 p. 1 000 de peptone pancréatique 5B des Établissements Vaillant. Le pH après stérilisation est souvent égal à 7,45.

I. — La *dose minima hémolytique* des diverses toxines botuliques examinées est recherchée dans des conditions analogues à celles que nous avons adoptées pour titrer différentes toxines gangréneuses [22].

Dans des tubes de 11 × 120 mm, nous répartissons des quantités décroissantes de culture centrifugée ou filtrée : nous ajoutons des

volumes différents de tampon-phosphate pH 6,5 (ou d'eau physiologique isotonique) pour amener à 0,9 ml le volume du liquide dans les tubes ; puis nous mettons dans chaque tube 0,1 ml d'une suspension à 5 p. 100 de globules rouges (frais et lavés) de mouton ; nous notons le volume de toxine qui détermine l'hémolyse totale des hématies. Tous les titrages sont faits en double. Dans les tubes témoins, nous mettons seulement 0,9 ml de tampon (3) ou d'eau physiologique, puis, 0,1 ml de la suspension globulaire. L'eau physiologique est amenée à pH 6,8-6,9 avant l'emploi.

II. — Pour savoir si nos préparations de toxines botuliques donnent la réaction de Nagler, nous procédons généralement ainsi : dans une série de tubes de 5,5×55 mm, nous distribuons des doses décroissantes de toxine filtrée ; nous ajoutons 0,05 ml de Cl_2Ca à 5 p. 100 ; nous complétons à 0,2 ml avec de l'eau physiologique ajustée à pH 6,8-6,9 ; puis nous introduisons dans chaque tube 0,2 ml de sérum humain (SH) ou 0,2 ml d'émulsion saline de jaune d'œuf frais de poule (LV) ; les tubes sont bouchés, agités, puis mis dans une étuve à 37° ; ils sont examinés seize à dix-huit heures plus tard. Nous notons le volume des toxines qui détermine une opalescence légère mais nette dans l'un des tubes ; ce volume représente la dose minima active (DMA) du filtrat considéré. Les doses les plus fortes déterminent une forte opalescence dans le SH et un précipité floconneux dans les émulsions LV. Ce précipité se rassemble généralement à la surface du liquide ; quelquefois, il se dépose quelques flocons au fond des tubes. La centrifugation ne détermine pas de sédimentation.

Dans les titrages témoins, la toxine répartie dans les tubes n'est pas additionnée de Cl_2Ca . Dans quelques essais complémentaires, nous avons mis dans les tubes contenant les doses décroissantes de toxine, 0,05 ml de Cl_2Mg à 5 p. 100 ou 0,05 ml de ClNa à 5 p. 100 (à la place de Cl_2Ca).

Le sérum humain que nous employons est filtré sur bougie puis chauffé pendant une heure à 56°. L'émulsion de jaune d'œuf frais est préparée selon le procédé de van Heyningen [23] et filtrée sur bougie L2.

III. *Titrages in vivo*. — Le titre léthal des toxines convenablement diluées est recherché sur souris blanches de 17 à 20 g ; volume des dilutions injecté dans les veines à chaque souris : 0,5 ml.

L'action nécrosante est déterminée sur cobayes blancs épilés ; volume injecté dans le derme : 0,1 ou 0,2 ml de toxine non diluée, préparée depuis des temps variables.

RÉSULTATS.

1. Toxine *botulinum A*.

Nous avons recherché les propriétés de la toxine de *Cl. botulinum A* préparée, soit dans des tubes de 22 × 220 mm contenant

(3) Le tampon de pH 6,5 est préparé ainsi : on ajoute 68 ml de phosphate monopotassique M/15 à 32 ml de phosphate disodique M/15, les deux solutions M/15 de phosphates étant faites avec de l'eau distillée additionnée de 9 p. 1 000 de ClNa .

du bouillon Vf glucosé, soit dans des sacs de cellophane remplis d'eau physiologique comme dans les expériences de Sterne et coll. [24], Vinet et Fredette [25]; dans nos essais, les sacs sont immergés dans du bouillon Vf alcalin glucosé à 2 p. 1 000.

a) *Cultures en tubes.* — 1° Expériences avec les souches Weinberg, Legroux, AC 22, AC 23. Les cultures faites à 37° ou à 32° sont centrifugées dix-huit à vingt heures après l'ensemencement des bouillons et titrées aussitôt. A la dose de 0,5 ml, les centrifugats ne lysent pas les hématies, même lorsqu'ils sont additionnés de 1 p. 1 000 de cystéine.

Après avoir fait subir à ces différentes souches quatre repiquages en bouillon Vf glucosé, les cultures de dix-huit à vingt heures n'ont pas été hémolytiques à la dose de 0,5 ml.

2° Expériences avec la souche Labo. Cultures à 37°. Centrifugations à intervalles rapprochés : quatre heures, six heures, huit, dix et treize heures après l'ensemencement des tubes. Les centrifugats sont respectivement numérotés IV, VI, VIII, X, XIII et titrés. Le premier et le dernier n'ont pas d'effet hémolytique à la dose de 1 ml ; par contre, les trois autres sont hémolytiques à la dose de 1 ml : les centrifugats VI et VIII lysent presque toutes les hématies employées dans le titrage et le centrifugat X lyse 50 p. 100 environ des hématies mises dans les tubes. De ceci, il ressort que les jeunes cultures de 4 heures ne manifestent pas encore d'action hémotoxique, que les cultures âgées de 6 à 10 heures lysent les hématies de mouton et que celles de 13 heures ne sont déjà plus hémolytiques. Le maximum d'activité est observé avec les cultures de 6 et 8 heures.

Après vingt-quatre heures de conservation à 2°, les centrifugats VI et VIII ne possèdent plus de propriétés hémolytiques. La cystéine ne les active pas.

b) *Cultures en sacs de cellophane.* — Expériences avec la souche Labo. Deux cultures préparées à 37° sont filtrées six jours après l'ensemencement. Les filtrats sont numérotés et titrés : ils ne lysent pas les hématies de mouton, même lorsqu'ils sont employés à la dose de 1 ml ; ils sont très nocifs *in vivo* : le filtrat I contient 100 000 DMm par millilitre et le filtrat II, 25 000 à 50 000. Ils donnent nettement la réaction de Nagler (4). La dose minima active (DMA) du filtrat I additionné de Ca et de SH est égale à 0,05 ml (5) et celle du filtrat II, à 0,07 ml dans les

(4) Les sérums anti-*perfringens*, anti-histolytiques empêchent l'effet de la toxine *botulinum* A sur l'émulsion de jaune d'œuf ; il est bien connu qu'ils ne suppriment pas l'action létale de cette toxine botulique.

(5) La toxine faite en même temps avec la souche Labo en tubes ordinaires doit être employée à la dose de 0,2 ml pour déterminer un léger trouble dans le SH + Ca.

mêmes conditions. Ces filtrats sont conservés à la température de 2° et examinés à intervalles de temps variables. En reprenant le même échantillon de SH que précédemment pour éprouver l'activité des filtrats, nous avons constaté que la DMA du filtrat I, cinq mois après sa préparation, était encore égale à 0,05 ml. D'après les titrages *in vivo*, ce filtrat contient alors 200 DMm par millilitre (souris); il détermine une escarre lorsqu'il est injecté dans le derme à la dose de 0,1 ml (cobaye).

Nous indiquons dans le tableau ci-dessus la DMA des deux

TABLEAU I.

Action de différentes préparations de toxine *botulinum* A, C et D sur des émulsions de jaune d'œuf frais de poule.

Numéro de la toxine filtrée	Toxine filtrée depuis	Dose minima active, en ml, sur les émulsions de jaune d'œufs				Numéro des émulsions
		toxine telle quelle	toxine + Cl ₂ Ca à 5 %	toxine + Cl Na à 5 %	toxine + Cl ₂ Mg à 5 %	
Toxine <u>botulinum</u> A						
I	5 mois	0,003	0,002			LV ₃
II	1 jour	0,001	0,004			LV ₁
	16 jours	0,00085	0,007			LV ₂
	30 jours	0,006	0,01	0,01	0,006	LV ₃
Toxine <u>botulinum</u> C						
III	16 jours	0,0007	0,0007			LV ₂
IV	1 jour	0,001	0,001			LV ₃
Toxine <u>botulinum</u> D						
	16 jours	0,2	0,2			LV ₂

filtrats titrés en présence de trois émulsions (LV₁, LV₂ et LV₃) préparées de la même manière mais avec trois œufs différents; on voit que dans les titrages avec l'émulsion LV₁, la DMA du filtrat II préparé depuis un jour est de 0,001 ml en l'absence de Cl₂Ca et de 0,004 ml en présence de ce sel (6). D'après les titrages réalisés avec les deux autres émulsions, le Cl₂Ca influence encore les résultats; la DMA du filtrat II, préparé depuis seize jours, titré avec l'émulsion LV₂, est de 0,00085 ml en l'absence de Cl₂Ca et de 0,007 ml en présence de ce sel. Pour interpréter ces faits inattendus, nous avons repris le titrage du même filtrat, mais cette fois-ci en comparant l'effet de trois chlorures: Cl₂Ca, ClNa et

(6) Les travaux de Mac Farlane, Oakley et Anderson (*J. Path. Bact.*, 1941, **52**, 99), Mac Farlane et Knight (*Bioch. J.*, 1941, **35**, 884) ont démontré que la toxine *perfringens* α décompose la lécithine du jaune d'œuf et que les ions Ca⁺⁺ intensifient les propriétés lécithinasiqes et hémolytiques de cette toxine.

Cl_2Mg à 5 p. 100. Les déterminations faites avec l'émulsion LV_3 montrent la concordance des résultats obtenus en présence de Cl_2Ca et de ClNa : en présence de l'un ou de l'autre de ces sels, il faut 0,01 ml de filtrat II pour troubler l'émulsion LV_3 ; en leur absence, il suffit de 0,006 ml de ce filtrat pour rendre opalescente la même émulsion ; d'après ces faits, les doses de Cl_2Ca et de ClNa utilisées semblent augmenter la stabilité des trois émulsions additionnées du filtrat indiqué. Mais il est à noter qu'une telle influence du Cl_2Ca n'est pas constante ; en effet, elle ne se manifeste pas dans le titrage du filtrat I en présence de l'émulsion LV_3 (voir tableau).

Nous avons étudié l'action de la chaleur sur le filtrat I préparé depuis cinq mois. Après trois minutes de chauffage à 100° , il ne détermine plus, même aux doses de 0,06 à 0,1 ml, un précipité floconneux dans l'émulsion LV_3 ; à ces doses, il fait seulement apparaître une très légère opalescence. Par contre, après trois minutes de chauffage à 70° , il peut encore, à la dose de 0,01 ml, provoquer la formation d'un abondant précipité dans l'émulsion. Mais ce filtrat chauffé à 70° pendant trois minutes perd son activité sur l'émulsion s'il est ensuite chauffé pendant trois minutes à 100° (après trois minutes de chauffage à 70° , le filtrat I contient moins de 2 DMm par ml).

Rappelons que d'après les titrages *in vivo* de Prévot et Brygoo [42] la toxine *botulinum* A perd sa nocivité en deux minutes à 60° .

2. TOXINE *botulinum* B.

Wheeler et Humphreys [4] n'ont pas indiqué la nature de la substance hémolytique que produisent les souches de *Cl. botulinum* B cultivées sur gélose au sang. Schoenholz [3] a attiré l'attention sur l'instabilité des propriétés hémolytiques de cultures de *Cl. botulinum* B faites en milieu liquide fortement glucosé.

Divers auteurs ont étudié l'influence du pH sur les variations du pouvoir létal des toxines B pendant la conservation. Prévot et Brygoo [42] précisent à ce sujet que l'action létale de la toxine B diminue, en vingt-quatre heures à 15° , de 50 p. 100 à pH 5 et de 95 p. 100 à pH 8 ; ces auteurs signalent en outre que les toxines alcalines qui se sont atténuées ne récupèrent pas leur action létale initiale lorsqu'on les acidifie.

a) D'après nos observations, la toxine *botulinum* B préparée avec la souche Meyer) contient une faible quantité d'hémolysine oxydable.

Les cultures obtenues à 32° ou 37° tirent en général 50 DMh par millilitre lorsqu'elles sont filtrées vingt heures après l'ensemencement des bouillons. L'activité hémolytique des filtres conservés à 2° diminue rapidement ; elle disparaît parfois en neuf jours. En ajoutant de la cystéine à des filtres maintenus depuis

cinq à neuf jours à la température de 2°, nous avons rétabli 40 à 50 p. 100 de l'activité hémolytique initiale.

Exemple : DMh d'un filtrat fraîchement préparé : 0,02 ml. DMh de ce filtrat après cinq jours de conservation à 2° : 0,6 ml en l'absence de cystéine et 0,04 ml en présence de 1 p. 1 000 de cystéine (1 mg de chlorhydrate de cystéine par millilitre de filtrat).

b) La toxine *botulinum* B, préparée avec les souches 200 et Petits Pois, détermine la formation d'un précipité floconneux dans les émulsions salines de jaune d'œuf.

3. TOXINE *botulinum* C.

Au début de notre exposé, nous avons signalé que la cystéine n'augmente pas l'action hémolytique des cultures âgées de seize à vingt-deux heures que nous préparons en bouillon Vf alcalin avec différentes souches de *Cl. botulinum* C ; les filtrats très hémolytiques de ces jeunes cultures perdent en quelques jours, à la température de 2° et au contact de l'air, une grande partie de leur effet hémotoxique ; les réducteurs restaurent l'activité des filtrats conservés pendant longtemps dans ces conditions ; exemple : la DMh d'une toxine C est égale à 0,002 ml le jour de la filtration ; elle est de 0,07 ml après treize mois de conservation à 2° ; la cystéine ou l'hydrosulfite Na ramènent à 0,002 ml la valeur de la DMh de ce vieux filtrat. En faisant agir trois jeunes toxines sur du SH et sur une émulsion LV, nous avons constaté qu'elles n'altéraient pas le SH même lorsqu'elles étaient employées à la dose de 0,2 ml ; par contre, il suffisait de 0,001 ml de l'une d'elles et il fallait 0,02 ml des deux autres pour déterminer une opalescence dans la LV.

Nous avons examiné les propriétés de quatre cultures de *Cl. botulinum* C faites dans des sacs de cellophane. Les sacs sont remplis d'eau physiologique, plongés dans du bouillon Vf glucosé additionné de peptone 5B, stérilisés à l'autoclave, puisensemencés, l'un, avec la souche W, les trois autres avec la souche Cid. Température de l'étuve pendant le développement microbien : 37°. Filtration des cultures *cinq jours* après l'ensemencement. Titrage immédiat des filtrats.

Titrages in vivo.

Le filtrat I (provenant de la culture faite avec la souche W) contient, par millilitre, 40 000 DMm (7) ; le filtrat II : 50 000 ; le filtrat III, moins de 50, et le filtrat IV, moins de 2 (ces trois derniers filtrats sont préparés à partir des cultures de la souche Cid).

Cinq mois après sa préparation, le filtrat II titre encore 50 000 DMm par millilitre ; mais après cinq minutes de chauff-

(7) La toxine préparée en même temps, avec la même souche, mais en tubes ordinaires, titre seulement 2 500 à 5 000 DMm par millilitre.

fage à 100°, il ne contient même pas 5 DMm par millilitre (souris).

Seize jours après sa préparation, le filtrat III ne provoque pas de lésions nécrotiques lorsqu'il est injecté à la dose de 0,2 ml dans le derme.

Action hémolytique in vitro.

La DMh des filtrats titrés en l'absence de cystéine est, suivant les préparations, égale à 0,01 ml ou 0,02 ml ; en présence de 1 p. 1 000 de cystéine, la DMh de ces filtrats est de 0,002 ou de 0,007 ml. La cystéine augmente donc nettement l'effet hémolytique des toxines *botulinum* C préparées en sac de cellophane. Selon nous, il existe de l'hémolysine oxydée dans les cultures âgées de 5 jours (8).

L'activité hémolytique des filtrats diminue plus ou moins vite à la température de 2° et au contact de l'air ; la cystéine augmente l'activité des toxines atténuées. Exemple : DMh du filtrat II fraîchement préparé : 0,02 ml en l'absence de cystéine, 0,004 ml en présence de cystéine ; DMh de ce filtrat après trois mois de conservation à 2° dans des tubes bouchés au coton : 0,03 ml d'après le titrage en l'absence de cystéine et 0,007 ml après addition de cystéine. Le filtrat III s'est atténué plus rapidement : il a perdu 60 p. 100 de son activité en trois semaines à 2°.

Nous avons recherché l'action de l'eau oxygénée sur ces deux filtrats conservés à 2°, l'un depuis trois mois et l'autre depuis trois semaines. Nous les avons additionnés de 1 p. 100 d'eau oxygénée à 130 volumes. En une heure, à la température de 37°, le premier a perdu 95 p. 100 de son action hémolytique et le deuxième 99 p. 100.

Réaction de Nagler.

a) *Toxines non chauffées.* — 1° La toxine *botulinum* C préparée en sac de cellophane donne la réaction de Nagler : nous avons déterminé une opalescence nette dans le sérum humain et dans l'émulsion de jaune d'œuf en ajoutant respectivement à ces réactifs 0,2 ml et 0,008 ml de filtrat III fraîchement préparé (titrages en présence de l'émulsion de LV₁ précédemment mentionnée à propos de la toxine *botulinum* A).

2° Les ions Ca n'influencent pas l'action de la toxine *botu-*

(8) D'après nos observations, *Cl. sordellii* élabore une hémolysine oxydable. La cystéine augmente quelquefois l'effet hémolytique des cultures de *Cl. sordellii* centrifugées seize heures après l'ensemencement des tubes de bouillon glucosé ; elle intensifie toujours fortement l'activité hémolytique à 37° des filtrats titrés après plusieurs jours de conservation à 2° [14 a].

linum C sur l'émulsion de jaune d'œuf : ainsi, la DMA du filtrat III est égale à 0,0007 ml et celle du filtrat IV à 0,001 ml (9), que les titrages soient réalisés en présence ou en l'absence de Cl_2Ca , les déterminations étant effectuées avec les émulsions LV_2 et LV_3 déjà citées (voir tableau). Au cours de ces titrages, nous avons utilisé le filtrat III, non nécosant, préparé depuis seize jours.

b) *Toxines portées à différentes températures.* — Des substances variées ont été étudiées au point de vue de leur thermorésistance. Des recherches d'Arrhenius (1907), de Landsteiner et Rauchenbichler (1909), il ressort que l'hémolysine staphylococcique α est plus inactivée par un chauffage à 65-70° que par un chauffage à 100° [26]. Durieux [27] a signalé que la sucrase de la levure, diastase thermolabile, est thermostable dans certaines conditions. D'après Bertrand et Rosenblatt [28], la catalase et la maltase de la levure ne peuvent être régénérées à 100° lorsqu'elles ont été inactivées par une minute de chauffage à 60°, 65° ou 70°.

La toxine botulique C α étudiée par I. Bengtson [29] n'est détruite qu'après quatre-vingt-dix minutes à 100°. La toxine C préparée par Frérot et Brygoo [42] perd son action létale en deux minutes à 90°.

En examinant l'action de la chaleur sur les divers types de toxine *perfringens* [30], nous avons mis en évidence ceci : a) après cinq minutes de chauffage à 70°, les toxines *perfringens* A, B, C, D, E, F fraîchement centrifugées ne sont plus nocives alors qu'elles le sont encore après cinq minutes de chauffage à 100° ; b) les toxines *perfringens* A, B, C, F inactivées par un chauffage de cinq minutes à 70° deviennent nocives lorsqu'elles sont ensuite maintenues pendant cinq minutes à 100° ; c) la filtration sur bougie ou le vieillissement modifient la thermolabilité de ces toxines ; d) la toxine *perfringens* A centrifugée devient plus ou moins opalescente au cours des divers chauffages ; nous supposons qu'il se forme un complexe atoxique pendant le court chauffage à 70° et que le chauffage ultérieur à 100° provoque une dissociation de ce complexe et la libération des antigènes nocifs de la toxine [30].

Smith et Gardner [31] ont confirmé que le chauffage à des températures supérieures à 70° inactivait moins la léciithinase *perfringens* que le chauffage à 70°.

Des parties aliquotes de toxine *botulinum* C sont portées pendant des temps variables dans des bains-marie maintenus à 70° ou 100° ; elles sont ensuite titrées vis-à-vis de la même émulsion de jaune d'œuf (LV_3) et en l'absence de Cl_2Ca . En expérimentant avec le filtrat atoxique IV, préparé depuis deux jours, nous avons obtenu les résultats suivants : DMA avant le chauffage : 0,001 ml ; après cinq minutes à 70° : 0,06 ml ; après cinq minutes à 100° :

(9) La dose minima active du filtrat IV vis-à-vis de l'émulsion LV_3 est égale à 0,001 ml que les dilutions du filtrat soient faites, pendant le titrage, avec de l'eau physiologique ordinaire ajustée à pH 6,9 ou 7,25, ou bien avec de l'eau physiologique additionnée de 5 p. 1 000 de peptone 5 B et ajustée à pH 7,25.

0,01 ml ; après deux chauffages successifs de cinq minutes chacun, le premier à 70° et le deuxième à 100° : 0,01 ml ; après quinze minutes à 100° : 0,02 ml ; après trente minutes à 100° : 0,04 ml ; après soixante minutes à 100°, le filtrat, à la dose de 0,2 ml, ne détermine pas de changement visible dans l'émulsion employée. De ces titrages en présence d'émulsion de jaune d'œuf, il ressort, d'une part, que la toxine *botulinum* C est moins active après cinq minutes de chauffage à 70° qu'après cinq minutes à 100° ; d'autre part, que l'activité de la toxine chauffée à 70° augmente pendant un chauffage ultérieur à 100°.

Au cours de ces titrages, nous avons fait la remarque suivante : après cinq minutes à 70° ou après trente minutes à 100° le filtrat IV, employé aux doses de 0,06 à 0,2 ml, trouble l'émulsion LV₃ mais ne fait pas apparaître de précipité floconneux ; par contre, après le chauffage de cinq minutes à 100° consécutif au chauffage de cinq minutes à 70°, le filtrat IV, employé aux doses de 0,04 à 0,2 ml, détermine un précipité aussi abondant que les mêmes doses de filtrat soumis à un seul chauffage de cinq minutes à 100°.

Fait intéressant à signaler ici : le filtrat IV, après cinq minutes de chauffage à 100°, ne lyse plus les hématies de mouton (même en présence de cystéine).

Nous avons testé le filtrat II cinq mois après sa préparation ; les titrages en présence de l'émulsion LV₄ indiquent ceci : DMA avant tout chauffage : 0,0006 ml ; après cinq minutes à 100° : 0,02 ml ; après cinq minutes à 70°, le filtrat est inactif à la dose de 0,15 ml ; mais lorsque ce filtrat inactivé en cinq minutes à 70° est ensuite porté à 100° pendant cinq minutes, il devient actif à la dose de 0,02 ml. Nous avons dit précédemment que ce filtrat n'est pas toxique *in vivo* après cinq minutes à 100°.

4. TOXINE *botulinum* D.

Les toxines *botulinum* D plus ou moins nocives *in vivo* que nous préparons en bouillon Vf avec la souche CN 2748 contiennent une hémolysine oxydable. A la dose de 0,04 ml, elles font apparaître une forte opalescence dans les émulsions de jaune d'œuf. La substance qui dénature l'émulsion de jaune d'œuf est distincte de l'hémolysine oxydable que nous trouvons dans ces toxines [15].

Nous avons préparé à 37° des cultures en sacs de cellophane avec une souche de *Cl. botulinum* D : souche D6 F. Une des cultures est filtrée cinq jours après l'ensemencement. Le filtrat toxique contient, d'après les titrages sur souris, 10 000 à 25 000 DMm par millilitre ; il n'est pas hémolytique à la dose de 1 ml en l'absence de cystéine, mais, en présence de 1 p. 1 000 de cystéine, il est capable à la dose de 0,06 ml de lyser toutes les hématies employées dans les titrages en milieu tamponné.

Ce filtrat, à la dose de 0,2 ml, ne modifie pas l'aspect du sérum humain, mais opacifie nettement une émulsion LV (titrages en présence ou en l'absence de Cl_2Ca).

RÉSUMÉ.

Le milieu nutritif utilisé au cours des recherches est du bouillon Vf glucosé, ajusté à pH 7,65 avant la stérilisation.

I. *L'effet hémolytique* des toxines botuliques est évalué en présence d'hématies lavées de mouton.

1° La toxine *botulinum* A perd très rapidement à 2° sa faible activité hémolytique et ne la récupère pas en présence de cystéine dans les conditions indiquées.

2° La toxine *botulinum* B contient souvent 50 DMh par millilitre ; son titre hémolytique diminue progressivement à 2° ; la cystéine augmente l'activité de la toxine atténuée.

3° La cystéine ne renforce pas le pouvoir hémolytique généralement élevé de la toxine *botulinum* C obtenue en seize à vingt-deux heures à la manière habituelle. Ce réducteur accentue nettement l'effet hémolytique de la toxine *botulinum* C prélevée dans des sacs de cellophaneensemencés depuis cinq jours. L'eau oxygénée atténue rapidement l'activité hémolytique de ces différentes préparations.

4° L'hémolysine de la toxine *botulinum* D est sensible aux phénomènes d'oxydo-réduction.

II. Des filtrats non hémolytiques de toxine *botulinum* A déterminent un précipité lipidique dans les émulsions salines de jaune d'œuf. Cette réaction n'est pas intensifiée par les ions Ca^{++} . Après trois minutes de chauffage à 70°, la toxine *botulinum* A fait encore apparaître un précipité dans les émulsions de jaune d'œuf ; après trois minutes de chauffage à 100°, elle ne possède plus cette propriété aux doses mentionnées.

Les filtrats des cultures *botulinum* A étudiés ne sont plus nocifs in vivo après trois minutes de chauffage à 70°.

Pendant la conservation, les toxines *botulinum* C et D contenant une hémolysine oxydable perdent plus rapidement la propriété de lyser les globules rouges de mouton que celle de changer l'aspect des émulsions de jaune d'œuf. Même après quinze minutes de chauffage à 100°, la toxine *botulinum* C provoque encore la formation d'un précipité dans ces émulsions.

Après cinq minutes de chauffage à 70° seulement, certaines préparations de toxine *botulinum* C décomposent encore l'émulsion de jaune d'œuf, mais elles sont moins efficaces qu'après cinq minutes de chauffage à 100° ; l'activité de la toxine chauffée à 70° augmente au cours d'un chauffage ultérieur de cinq minutes à 100°.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. W. WHEELER et E. HUMPHREYS. *J. inf. Dis.*, 1924, **35**, 305.
- [2] P. SCHOENHOLZ. *J. inf. Dis.*, 1928, **42**, 40.
- [3] P. SCHOENHOLZ. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1924, **22**, 121.
- [4] P. SCHOENHOLZ et K. F. MEYER. *J. inf. Dis.*, 1924, **35**, 361.
- [5] C. LAMANA et J. P. LOWENTHAL. *J. Bact.*, 1951, **61**, 751.
- [6] R. WILLEMS. *Acta Biol. Belg.*, 1941, **3**, 353 et 396 ; *Ann. Méd. vétér.*, 1942, **86**, 33.
- [7] A.-R. PRÉVOT et E. BRYGOO. *Ces Annales*, 1950, **78**, 274.
- [8] E. R. BRYGOO. *Ces Annales*, 1950, **78**, 795.
- [9] A.-R. PRÉVOT et E. R. BRYGOO. *Ces Annales*, 1950, **79**, 1.
- [10] A.-R. PRÉVOT, M. HUET et P. TARDIEUX. *Bull. Acad. vétér.*, 1950, **23**, 48.
- [11] A.-R. PRÉVOT et E. R. BRYGOO. *Ces Annales*, 1953, **84**, 1037.
- [12] A.-R. PRÉVOT et E. R. BRYGOO. *Ces Annales*, 1953, **85**, 554.
- [13] VI^e Congrès intern. Microb., Rome, 6-12 septembre 1953. *Riassunti delle comunicazioni*, vol. I, II et III.
- [14] M. GUILLAUMIE et A. KRÉGUER. *Ces Annales* : a) 1950, **78**, 467 ; b) 1950, **79**, 20 ; c) 1950, **79**, 661.
- [15] M. GUILLAUMIE et A. KRÉGUER. *C. R. Soc. Biol.*, 1951, **145**, 179.
- [16] E. M. CROOK. *Brit. J. exp. Path.*, 1942, **23**, 37.
- [17] J. H. MASON et E. M. ROBINSON. *Onderst. J. vet. Sci.*, 1935, **5**, 65.
- [18 a] D. A. BOROFF, M. RAYNAUD et A.-R. PRÉVOT. *J. Immunol.*, 1952, **68**, 503.
- [18 b] J. B. GUNNISSON. VI^e Congrès intern. Microb., Rome, 1953. *Riassunti delle comunicazioni*, vol. II, p. 586.
- [19] C. LAMANA et W. I. JENSEN. *Soc. Am. Bact.*, in *Bacter. Proc.*, 1952, **1**, 106.
- [20] M. STERNE. *Science*, 1954, **119**, 440.
- [21] R. V. KATITCH. *Office intern. Epiz.* Rapport à la XXII^e Session, 1954, R. n^o 318.
- [22] M. GUILLAUMIE. *Ces Annales*, 1941, **66**, 329 ; *id.*, 1942, **68**, 84. *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **146**, 140.
- [23] W. E. VAN HEYNINGEN. *Biochem. J.*, 1941, **35**, 1246.
- [24] L. M. WENTZEL et M. STERNE. *Science*, 1949, **110**, 259. — M. STERNE, P. THOROLD et J. R. SCHENBER. *J. comp. Path.*, 1951, **61**, 150.
- [25] G. VINET et V. FREDETTE. *Science*, 1951, **114**, 549.
- [26] S. ARRHENIUS. *Immunochemie*, Akad. Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1907. — K. LANDSTEINER et R. VON RAUCHENBICHLER. *Z. Immunf.*, 1909, **1**, 439.
- [27] O. DURIEUX. *Bull. Soc. Chim. biol. de Belgique*, 1914, **28**, 99.
- [28] G. BERTRAND et M. ROSENBLATT. *Bull. Soc. Chim.*, 1914, **15**, 762.
- [29] I. BENGSTON. *Publ. Health Rep.*, 1923, **38**, 340.
- [30] M. GUILLAUMIE, A. KRÉGUER et M. FABRE. *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138**, 273, 302 et 794. *Ces Annales*, 1946, **72**, 12 et 384. *Rev. Immunol.*, 1950, **14**, 9. *C. R. Soc. Biol.*, 1951, **145**, 981.
- [31] L. D. SMITH et M. V. GARDNER. *Arch. Biochem.*, 1950, **25**, 54.

NUTRITION AZOTÉE ET SPORULATION DE *BACILLUS CEREUS* VAR. *MYCOIDES*

par NORBERT GRELET. (*) (**).

(Institut Pasteur. Service des Fermentations.)

Dans une série de travaux antérieurs, nous avons étudié le déterminisme de la sporulation de *B. megaterium* [6]. La croissance de ce bacille dans un milieu synthétique où le glucose est la seule source carbonée, et le nitrate la seule source azotée, nous a facilité l'analyse du rôle de chacun des constituants du milieu. Nous avons été conduit à voir dans la sporulation une réponse à une pénurie de certains aliments, par exemple l'aliment carboné ou l'aliment azoté.

Mais pour la culture d'autres espèces, telles *B. anthracis*, *B. cereus* et *B. cereus* var. *mycoides*, des acides aminés et parfois des facteurs de croissance sont soit indispensables, soit au moins favorables [5, 4, 15, 11, 19].

Beaucoup d'observations ont donc été accumulées sur le rôle des divers aliments azotés dans la sporulation.

A un milieu où la sporulation est presque complète, Tarr, 1932 [18], ajoute des acides aminés ou de l'asparagine, et observe la chute du pourcentage de spores. De plus, un milieu synthétique contenant asparagine, glycine, alanine, leucine, acide glutamique et tryptophane ne permet la sporulation que s'il est suffisamment dilué.

Dans les années récentes, l'attention a été particulièrement attirée par l'alanine : dans la sporulation [3], dans la germination [9, 10, 12], dans l'activité enzymatique de la spore [17].

D'autres acides aminés ont aussi été mis en relation avec la sporulation : la leucine et l'isoleucine [3], la leucine et la méthionine [23], l'isoleucine, la méthionine et la phénylalanine [7].

Très sommairement, on pourrait conclure de ces divers travaux : la sporulation est « inhibée » par l'alanine ; elle est « stimulée » par la leucine, l'isoleucine, la méthionine, la phénylalanine.

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 3 juin 1954.

(**) Travail réalisé avec la collaboration technique de M^{lle} C. Lauth, à qui l'auteur exprime ses remerciements.

Mais les termes d'inhibition et de stimulation sont imprécis : lorsque dans un milieu les sources carbonées et azotées sont multiples, il n'est pas facile d'interpréter l'effet qu'exerce sur l'apparence globale de la sporulation, l'acide aminé qu'on ajoute au milieu, ou qu'on en retranche.

En effet, un acide aminé, s'il est assimilable, est d'abord une source carbonée et azotée banale qui s'ajoute aux autres sources. Il peut, de plus, jouer un rôle spécifique d'aliment indispensable ou seulement préférentiel ; ou bien au contraire présenter seul ou avec les autres acides aminés des effets de toxicité ou d'antagonisme [5]. Son métabolisme au cours de la culture, l'évolution du pH et l'apparition des produits intermédiaires peuvent toucher la sporulation.

Enfin, il ne suffit pas qu'un acide aminé soit présent dans le milieu initial, pour que l'on puisse définir son rôle : il faut encore savoir à quel stade de la culture il est épuisé, et en particulier s'il est encore présent au moment où se produit la sporulation.

Nous nous proposons ici de rechercher si, dans les cultures de *B. cereus* var. *mycoides* en milieu synthétique agité, il existe une relation entre les limitations de la croissance apportées par l'absence ou l'épuisement des acides aminés, et la formation des spores.

SOUCHES ET TECHNIQUES.

SOUCHES, STOCKS DE SPORES ET ENSEMENCEMENT. — Nous avons recherché une souche de *B. cereus* ou de *B. cereus* var. *mycoides* qui croisse bien dans un milieu contenant glucose et hydrolysât de caséine sans facteurs de croissance, et qui d'autre part paraisse répondre à la présence d'alanine dans un milieu contenant glucose et acides aminés.

Nous avons retenu un variant de la souche *B. cereus* var. *mycoides* Smith n° 233 [15], Collection de l'Institut Pasteur n° 5259.

La souche mère, notre variant A, donne sur moût de bière gélosé des colonies typiques en boucles. Après huit jours à 30°, il apparaît des colonies secondaires sur le tronc des arborescences. Par repiquage d'une colonie secondaire, on obtient encore sur moût de bière gélosé une colonie de type *mycoides*, mais plus compacte ; il ne se forme plus de colonies secondaires ; c'est notre variant B, avec lequel a été effectué le travail décrit ici.

Pour la préparation des stocks de spores, le variant B a été ensemencé en milieu liquide contenant sels, hydrolysât de caséine privé de vitamines (46 mM d'azote-Kjeldahl) et glucose (25 mM). Dans la culture agitée de soixante-dix heures, le glucose est épuisé et la sporulation est totale. Une dilution au 1/10 de la culture, maintenue à 80° pendant quinze minutes, est répartie en tubes scellés qui sont gardés à la glacière.

Pour une expérience de comparaison des cultures sur plusieurs milieux, on prépare généralement, à partir du stock de spores, une

culture préliminaire (inoculat) en milieu liquide agité. Après vingt-quatre heures en hydrolysât de caséine, ou quarante-huit heures en mélange d'acides aminés, l'inoculat, dont l'opacité est encore très faible, sert à ensemencer les milieux.

MILIEUX. — La composition minérale des milieux est celle que nous avons donnée pour *B. megaterium* [6] ; toutefois, nous avons pu réduire Cl_2Ca de 1 mM à 0,1 mM sans observer d'effets sur la sporulation ; l'avantage est de diminuer le trouble dans le milieu initial et de faciliter les mesures de néphélométrie.

D'autre part le pH initial est amené à 7,4.

La composition minérale s'établit donc ainsi : SO_4Mg , 0,5 mM ; SO_4Mn , 0,01 ; $(\text{SO}_4)_3\text{Fe}_2$, 0,05 ; SO_4Zn , 0,05 ; SO_4K_2 , 1,0 ; Cl_2Ca , 0,1 ; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 50 ; KOH , 42,5.

Le nitrate est supprimé et remplacé par d'autres sources d'azote.

L'hydrolysât de caséine, privé de vitamines, est préparé selon Clegg, Kodicek et Mistry [2].

Par commodité, nous gardons le symbole mM (millimolécule par litre) pour exprimer une concentration de 14 mg d'azote-Kjeldahl par litre, dans les solutions d'hydrolysât de caséine.

Les acides aminés sont ceux du commerce, sans purification supplémentaire.

CONDITIONS DE CULTURE ET MESURES NÉPHÉLOMÉTRIQUES. — Les cultures sont faites en milieu liquide agité, à la chambre-étuve à 30° [6].

Pour l'établissement des courbes de croissance à leur début, nous utilisons des tubes calibrés de diamètre 25 mm, contenant 25 cm³ de milieu, et agités en position inclinée. Ces tubes permettent une mesure directe de néphélométrie à l'électrospectrophotomètre Coleman.

Pour les cultures prolongées et denses, où l'on veut assurer une meilleure aération, nous utilisons les flacons d'Erlenmeyer de 500 cm³ contenant 50 cm³ de milieu. La densité optique d'une dilution au 1/20 d'une culture, en tube calibré de diamètre 19 mm, lue à l'appareil Coleman à 700 mμ est multipliée par un coefficient 50 pour donner une estimation grossière en grammes par litre de la matière sèche.

TECHNIQUES DES EXAMENS ET DOSAGES. — *Observation microscopique* : L'état de la culture observée *in vivo* est décrit sommairement avec évaluation approximative des proportions de bâtonnets non sporulés, de spores incluses dans les bâtonnets et de spores libres.

Glucose : Le glucose est dosé directement dans le milieu de culture par la méthode de Somogyi [16].

Chromatographie sur papier des acides aminés : La chromatographie à une dimension des milieux de culture, débarrassés des corps bactériens par centrifugation, est faite avec le butanol acétique, selon la méthode de Woiwod [24]. Pour des concentrations initiales d'azote aminé de l'ordre de 100 mM, V gouttelettes de milieu de culture sont successivement déposées au même point sur le papier, dans un cercle de 2 mm de diamètre.

La méthode est rendue semi-quantitative en chromatographiant simultanément avec les milieux de culture, divers volumes d'un

milieu synthétique initial qui contient des concentrations connues des divers acides aminés.

La comparaison des taches après chromatographie et révélation par la ninhydrine permet de suivre l'utilisation et la disparition des acides aminés.

Les taches de leucine et d'isoleucine ne sont pratiquement pas séparées, et sont par conséquent évaluées ensemble.

Les taches ne sont pas perturbées par la présence des sels minéraux du milieu, ni par la présence du glucose lorsque celui-ci est à une concentration égale ou inférieure à 100 mM (soit 18 g/l).

PARTIE EXPÉRIMENTALE.

LE BESOIN D'AZOTE AMINÉ. — La souche étudiée, *B. mycoides* Smith n° 233, variant B, ensemencée dans un milieu contenant ammoniacque et glucose, en absence d'acides aminés, ne croît pas pendant plusieurs jours.

Tardivement, il se produit, en milieu liquide, une croissance lente, et sur milieu gélosé, quelques colonies. Par des repiquages répétés, nous avons pu obtenir des variants prototrophes, paraissant parfois asporogènes.

Au contraire, un milieu contenant hydrolysât de caséine privé de vitamines et glucose permet la croissance immédiate et rapide (taux de croissance : 0,8 à 30°) de la souche étudiée, qui a donc besoin pour croître d'azote aminé, mais non de facteurs de croissance.

Avec une concentration initiale suffisamment élevée d'hydrolysât de caséine (155 mM d'azote) et de glucose (250 mM), la culture s'alcalinise et ne sporule pas.

Si on diminue la teneur initiale en hydrolysât de caséine pour en faire le facteur limitant de la croissance, le glucose demeure en excès, mais la sporulation se produit ; elle est d'autant plus complète qu'il y a moins d'hydrolysât de caséine initialement (par exemple 5 mM d'azote), et que la croissance est arrêtée à une plus faible densité bactérienne.

D'autre part, dans un milieu sans glucose, la croissance a lieu aux dépens de l'hydrolysât de caséine, aliment à la fois carboné et azoté ; mais on observe que la sporulation commence, alors que la culture est encore peu dense et continue à croître ; plus tard, lorsque la sporulation est devenue totale, il reste dans le milieu des acides aminés en excès, principalement du glutamate.

Il apparaît donc que la sporulation résulte d'un mécanisme plus spécifique que le simple épuisement de l'ensemble des aliments carbonés ou de l'ensemble des aliments azotés.

Nous sommes ainsi conduit à rechercher parmi les acides aminés de l'hydrolysât de caséine ceux qui sont essentiels.

ETABLISSEMENT D'UN MILIEU SYNTHÉTIQUE TÉMOIN. — Nous entendons par milieu témoin un milieu qui permet une croissance prolongée à taux constant, sans sporulation. A partir de la composition de ce milieu témoin, on peut étudier les effets de

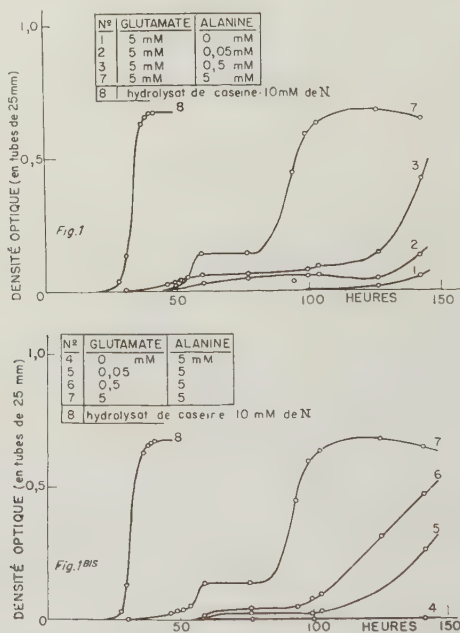


FIG. 1 et 1 bis. — Courbes de croissance en présence d'hydrolysate de caséine, ou de concentrations variées de glutamate et d'alanine (sans autres acides aminés). Les milieux contiennent du glucose : 100 mM. Ensemencement direct avec les spores (sans inoculat végétatif). Cultures en tubes de diamètre 25 mm., agités à 30°.

chacun de ses constituants sur la croissance et la sporulation, en en faisant varier la concentration.

Parmi les acides aminés, nous avons essayé d'abord, en raison du travail de Foster et Heiligman [3], le glutamate de K et l'alanine (fig. 1).

Avec alanine seule et glucose, on n'observe aucune croissance pendant longtemps ; puis, cent, cent cinquante, deux cents heures ou même plus après l'ensemencement, une culture se développe lentement.

Avec glutamate seul et glucose, le départ de la culture a lieu environ vingt heures après celui d'une culture en hydrolysate de caséine. Mais de cinquante à cent heures un palier à très faible densité optique interrompt la croissance, alors que le

glutamate n'est encore presque pas utilisé ; il paraît donc que le départ de la culture a été rendu possible par la présence d'impuretés dans le glutamate, et que la croissance s'arrête une fois ces impuretés épuisées. Plus tard, la croissance reprend et le glutamate est utilisé.

L'addition d'un peu de glutamate à l'alanine, ou d'un peu d'alanine au glutamate, hâte le départ des cultures et le rap-

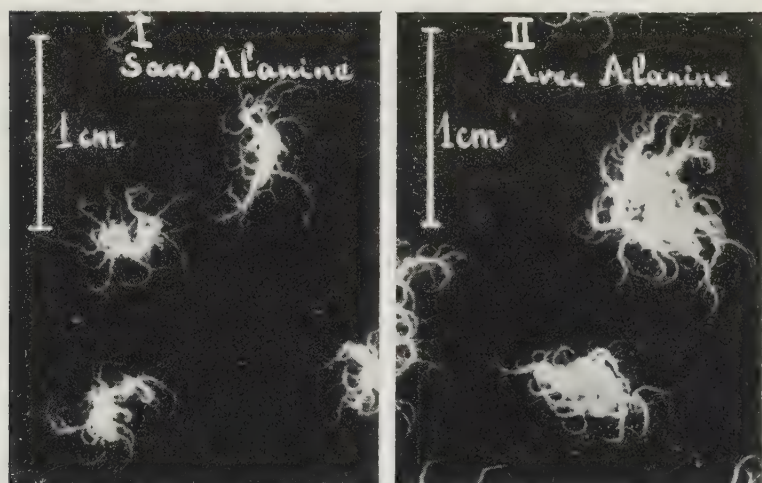


FIG. 2. — *Bacillus mycoides* Smith n° 233 variant B. Colonies de 5 jours sur milieu synthétique gélosé.

I, glucose 250 mM, glutamate 5 mM.

II, glucose 250 mM, glutamate 5 mM; alanine 5 mM.

(Photomicrographie de l'Institut Pasteur).

proche du départ des cultures sur hydrolysate de caséine. Le départ le plus précoce a lieu lorsque les concentrations moléculaires initiales du glutamate et de l'alanine sont du même ordre : par exemple 5 ou 10 mM de l'un et de l'autre.

La taille des colonies développées sur milieu synthétique gélosé illustre l'effet favorable de l'alanine ajoutée au glutamate (fig. 2).

Pourtant le milieu glutamate-alanine-glucose n'est pas le milieu témoin cherché. Après une première phase de croissance, on observe encore un palier accompagné de sporulation partielle, bien que glutamate et alanine soient encore en gros excès et donnent lieu ultérieurement à de nouvelles phases de croissance.

Nous avons alors ajouté un troisième acide aminé à une concentration telle qu'elle soit avec la concentration du glutamate dans

le même rapport que dans la caséine [13]. Six acides aminés ont ainsi été essayés avec L(+)glutamate et L(+)alanine : L(—)aspartate de K, DL méthionine, L(+)valine, L(—)leucine, L(+)isoleucine et nitrate de L(+)arginine.

L'aspartate, la méthionine et la valine n'empêchent pas le palier de croissance et la sporulation. La leucine et l'isoleucine ont un effet inhibiteur sur la croissance. L'arginine ralentit la croissance et n'empêche pas la sporulation.

En revanche, si on ajoute ensemble les six acides aminés, on obtient une belle culture. Ce milieu peut être simplifié : on supprime l'arginine avec avantage, l'aspartate et la méthionine sans inconvénients. On aboutit ainsi à un milieu relativement simple, qui nous a servi de milieu témoin dans les expériences suivantes (voir cultures n° 1 dans les tableaux I, II et III, et les fig. 3, 4 et 5).

Ce n'est pourtant pas sans doute un milieu témoin parfait, car on observe souvent quelques spores dans les cultures alors que les cinq acides aminés et le glucose sont encore présents, ce qui paraît indiquer que subsiste un besoin relatif non satisfait en d'autres acides aminés.

La composition de ce milieu témoin s'établit ainsi :

Milieu salin (à pH 7,4)

L (+) glutamate de K.	50 mM
L (+) alanine.	50
L (+) valine	15
L (—) leucine.	8,6
L (+) isoleucine	8,2
Glucose.	150 ou 100

TABLEAU I. — Effets du glutamate (cultures en flacons agités, faites en même temps que les cultures en tubes agités de la fig. 3).

N° des cultures	-h-		mM				g/l		Sporulation	Examen microscopique
	Durées des cultures		Glutamate	Alanine	Valine	Leucine et Isoleucine	Glucose	Mat. sèche		
1	0	50	50	15	8 & 8	27,0				
	62	50	40	10	12	26,0	2,5	(+)		Rares chaînes avec 1-2 spores incluses
	86	40	0	0	0,5	20,2	10,0	+		Quelques chaînes (environ 10%) avec sp. incl.
	134	40	0	0	0	11,8	4,7	+		Quelques chaînes avec sp. incl. : rares sp. libres
2	0	5	50	15	8 & 8	27,0				
	62	5	50	15	16		0			
	86	3	40	12	12	26,0	1,4	+		Quelques chaînes avec sp. incl.
	110	2	20	5	2	15,6	5,5	+		Quelques chaînes avec sp. incl.
3	134	2	10		0	12,9	4,1	+		Quelques chaînes avec sp. incl. et sp. libres
	0	0	50	15	8 & 8	27,0				
	264	0	50	15	16		0			
	312	0	45	15	16		1,7	+		Quelques chaînes avec sp. incl.

EFFETS DU GLUTAMATE. — Quand on supprime le glutamate dans la formule du milieu témoin, la présence de valine, leucine, isoleucine n'a pas d'effets au moins immédiats : comme pour l'alanine seule, on n'observe d'abord pas de croissance jusque vers cent cinquante heures ; puis une culture apparaît qui se maintient à très faible densité optique de cent cinquante à deux

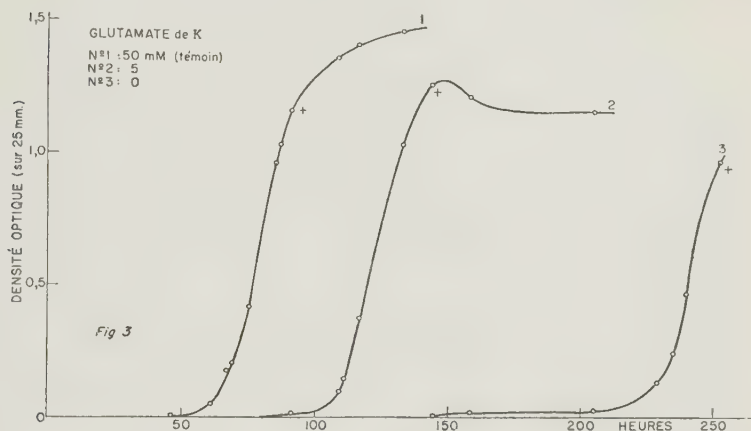


FIG. 3. — Effet du glutamate (même expérience que tableau I). Les milieux ont la composition du milieu témoin, sauf pour le glutamate dont les concentrations sont indiquées sur la figure ; ensemencement avec jeune culture en milieu hydrolysate de caséine-glucose, diluée à 1/3 000 ; cultures en tubes de diamètre de 25 mm, agités à 30° ; le signe + indique le degré de sporulation : (voir tableau I).

cents heures ; la croissance part enfin plus rapidement (tableau I et figure 3 : culture n° 3).

D'autres acides aminés paraissent capables de remplacer le glutamate : dans une expérience où, à la formule du milieu témoin, s'ajoutait L (—) aspartate (10 mM) et DL méthionine (5 mM), la suppression du glutamate n'a retardé le départ de la culture que d'environ douze heures.

Quel est donc le rôle du glutamate dans le milieu témoin ?

On observe que, avec une concentration initiale de 50 mM, le glutamate demeure très longtemps en large excès, alors que tous les autres acides aminés sont épuisés (tableau 1, culture n° 1).

On pourrait donc penser qu'il y a trop de glutamate dans le milieu témoin.

Mais si on réduit sa concentration à 5 mM, on constate que la culture part plus tard, que le développement maximum est moindre, et que pourtant le glutamate n'est pas épuisé encore

lors du dernier prélèvement à cent trente-quatre heures (culture n° 2).

Lorsque la concentration d'alanine est élevée par rapport à celle du glutamate, les cultures sont retardées. Le glutamate à concentration élevée a donc d'abord pour rôle d'annuler l'effet inhibiteur d'une concentration élevée d'alanine.

D'autre part les acides aminés, en particulier l'alanine, sont moins vite épuisés dans le milieu qui contient 5 mM de glutamate, que dans celui qui en contient 50 mM.

Ainsi le glutamate exerce par sa concentration même un effet sur l'utilisation des autres acides aminés et sur la croissance.

Dans tous ces cas, on observe bien quelques spores, mais aucune sporulation massive. Il faut souligner que nous n'avons pas obtenu l'épuisement d'une quantité initiale de glutamate. On ne peut donc pas dire, d'après ces cultures, ce qui se produirait si une pénurie radicale de glutamate était imposée à des bacilles en croissance.

TABLEAU II. — Effets de l'alanine (cultures en tubes agités : même expérience que fig. 4).

N° des cultures	Durée des cultures -h.-	mM				g/l		Sporulation	Examen microscopique
		Glutamate	Alanine	Valine	Leucine et Isoleucine	Glucose	Mat. sèche		
1	0	50	50	15	8 & 8	22			
	37	50	4	2	0			(+)	Rares chaînes avec 1 sp. incl.
	62	15	0	0	0			(+)	Rares chaînes avec 1 sp. incl.
	110	0,5	0,5	0	0	0	12	+	Quelq. chaînes avec 1-2 sp. incl.
2	0	50	5	15	8 & 8	22			
	37	50	0	2	2			++	Nombreuses chaînes avec 1 à 4 sp. incl.
	62	50	0	0,5	2			++	Nombreuses chaînes avec 1 à 4 sp. incl.
	110	50	0	0	1	13,2	2,9	++	Sp. libres et bâtonnets non sporulés.
3	0	50	1	15	8 & 8	22			
	37	50	0	10	4			+++	Toutes les chaînes avec sp. incl. dans environ la moitié des bâtonnets.
	62	50	0	8	2			+++	Sp. incl. dans presque tous les bâtonnets; quelques sp. libres.
	110	50	0,5	8	2	16,0	1,1	+++	Sp. libres. Quelques bâtonnets non sporulés.
4	0	50	0	15	8 & 8	22			
	37	50	0	10	4			+++	Toutes les chaînes avec sp. incl. dans environ la moitié des bâtonnets.
	62	50	0	10	4			+++	Sp. incl. dans presque tous les bâtonnets.
	110	50	0,5	10	4	15,8	1,1	+++	Sp. libres.

EFFETS DE L'ALANINE. — Dans le milieu témoin l'alanine est rapidement utilisée.

En diminuant ou en annulant la concentration initiale d'alanine (tableau II et fig. 4), on en fait le facteur limitant de la croissance pour une longue période.

Dans le milieu sans alanine (culture n° 4) il se produit encore une croissance initiale qui est due peut-être à une faible quantité d'alanine apportée par l'ensemencement ou les impuretés des autres acides aminés, en particulier du glutamate.

Les cultures où la croissance est arrêtée par suite de l'épuisement ou de l'absence de l'alanine, sporulent. Moins il y a

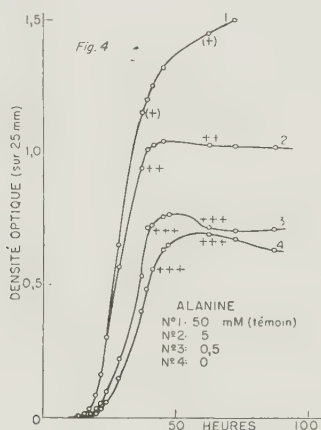


FIG. 4. — Effets de l'alanine (même expérience que tableau II). Les milieux ont la composition du milieu témoin, sauf pour l'alanine dont les concentrations sont indiquées sur la figure; ensemencement avec jeune culture en milieu témoin, dilué à 1/4 000; cultures en tubes de diamètre de 25 mm, agités à 30°; les signes + indiquent le degré de sporulation (voir tableau II).

d'alanine initialement dans le milieu, plus la sporulation est générale.

Dans la culture en milieu témoin, une fois l'alanine épuisée, on n'observe pas de sporulation générale, mais seulement quelques bâtonnets contenant des spores incluses. Il se peut qu'au moment où l'alanine est épuisée, la culture soit déjà entraînée à croître sur glutamate, et ne présente alors ni palier de croissance, ni sporulation généralisée.

Les cultures qui sporulent en absence ou après épuisement de l'alanine, présentent elle-mêmes après cinq à huit jours des reprises tardives de croissance aux dépens du glutamate, avec de longs bacilles très grêles d'aspect typique.

Sur les chromatogrammes effectués au moment où ces cultures sont sporulées (tableau II : cultures de 110 h.), on remarque une faible tache au niveau de l'alanine; celle-ci a sans doute été libérée par la lyse des sporanges; cette trace d'alanine peut jouer un rôle dans la reprise ultérieure de la croissance.

Les faits que nous venons de décrire supportent deux interprétations : ou bien la présence d'alanine inhibe la sporulation ; ou bien la pénurie d'alanine, lorsque la souche n'y est pas encore entraînée, provoque la sporulation.

Nous allons montrer maintenant que la présence d'alanine n'inhibe pas la sporulation.

EFFETS DE LA VALINE, DE LA LEUCINE ET DE L'ISOLEUCINE. — Pour réaliser un milieu témoin, nous avons été amené à ajouter au glu-

TABLEAU III. — Effets de valine-leucine et isoleucine (cultures en tubes agités : même expérience que fig. 5).

N° des cultures	-h-		mM				Sporulation	Examen microscopique
	Durée des cultures		Glutamate	Alanine	Valine	Leucine et Isoleucine		
1	0	50	50	15		8 & 8		
	24	50	40	10		10	-	Pas de spores
	31						(+)	Rares chaînes avec 1-2 sp. incluses
	47	50	0	1		1		
	59						+	Quelques chaînes avec 1-2 sp. incl.
	71	40	0	0		0		
2	0	50	50	1,5		0,8 & 0,8		
	24	50	30	0		0	-	Pas de spores
	31						+	Quelques chaînes avec 1-2 sp. incl.
	47	50	2	0		0		
	59						+	Quelques chaînes avec 1-2 sp. incl. Rares sp. libres
	71	40	1	0		0		
3	0	50	50	0		0 & 0		
	24	50	40	0		0	+	Quelques chaînes avec sp. dans environ la moitié des bâtonnets.
	31						++	Spores incl. dans environ la moitié des bâtonnets.
	47	50	40	0		0		
	59						++	Sp. libres; Quelques sp. incl. Reprise de la croissance avec bacilles grêles en chaîne de 4.
	71	40	0	0		0		

tamate et à l'alanine les trois acides aminés valine-leucine-isoleucine, dans le même rapport avec le glutamate que dans la caséine.

Lorsqu'on change ces concentrations, ou que l'on supprime l'un de ces trois acides aminés, on observe, pour certaines combinaisons, les retards ou les inhibitions de la croissance que Gladstone 1939 [5] a décrits avec *B. anthracis*.

Avec notre souche de *B. mycoides*, les deux milieux qui inhibent le plus fortement la croissance sont, d'une part, celui qui contient l'isoleucine 8 mM, sans valine ni leucine, d'autre part, celui qui contient la valine 15 mM et la leucine 8 mM, sans isoleucine. Dans le milieu témoin, les trois acides aminés à ces

mêmes concentrations annulent mutuellement leurs effets inhibiteurs.

L'ampleur de ces effets inhibiteurs varie avec la composition du milieu dans lequel a été cultivé l'inoculat. De plus, la souche étudiée ici, comme celle de Gladstone, peut être entraînée à surmonter ces effets inhibiteurs.

Envisageons maintenant l'état de sporulation des cultures, en

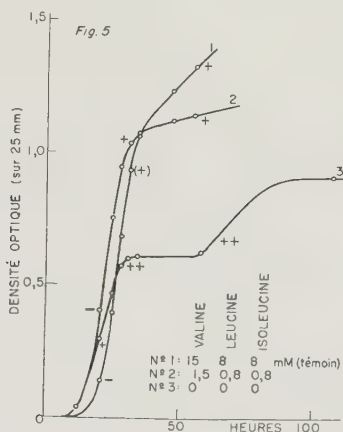


FIG. 5. — Effets de valine-leucine-isoleucine (même expérience que tableau III); les milieux ont la composition du milieu témoin, sauf pour la valine, la leucine et l'isoleucine dont les concentrations sont indiquées sur la figure; ensemencement avec jeune culture en milieu témoin, dilué à 1/4 000; cultures en tubes de diamètre 25 mm, agités à 30°; les signes — et + indiquent le degré de sporulation (voir tableau III).

fonction de la présence de la valine, de la leucine et de l'isoleucine.

Dans les milieux déséquilibrés (isoleucine ou valine-leucine), l'arrêt précoce de la croissance à une très faible densité n'entraîne pas de sporulation.

Au contraire, dans le milieu glutamate-alanine-glucose, sans valine, ni leucine, ni isoleucine (tableau III et figure 5: culture n° 3), un début de croissance a lieu, par suite sans doute de la présence d'impuretés, puis on observe un palier de croissance, accompagné d'une sporulation qui intéresse au moins la moitié des bâtonnets; l'alanine demeure en gros excès durant cette sporulation. Plus tard, la croissance reprend aux dépens de l'alanine qui est épuisée avec une nouvelle étape de palier et de sporulation, puis aux dépens du glutamate.

Avec le milieu qui contient initialement en valine, leucine et isoleucine, le dixième des concentrations du milieu témoin, on

constate parfois une sporulation partielle avec une croissance lente ; d'autre fois une sporulation importante avec palier de croissance, une fois épuisés les trois acides aminés.

En tout cas, la sporulation qui se produit par suite de l'absence ou de l'épuisement de la valine, la leucine et l'isoleucine, n'est pas inhibée par le glutamate ou l'alanine qui restent présents.

DISCUSSION.

Lorsque nous avons commencé ce travail, nous faisons l'hypothèse que l'épuisement d'un facteur de croissance ou d'un acide aminé indispensable entraînerait la sporulation totale et définitive de la culture.

Mais les souches que nous avons étudiées jusqu'ici n'ont pas besoin de facteurs de croissance, et aucun acide aminé ne paraît leur être strictement indispensable : en absence de tel ou tel acide aminé, ou même en absence de tout acide aminé, sur ammoniacque seule, la croissance finit par se produire après plus ou moins longtemps.

Gladstone [5] entraîne même *B. anthracis* à croître sur ammoniac sans acides aminés.

La question demeure ouverte de savoir si cet entraînement a lieu par sélection de mutants, ou par une auto-adaptation du type de celle que décrit Wright [25] dans une population de *Escherichia coli* exigeant la glycine.

Il n'en reste pas moins que les souches typiques de *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides* ont besoin d'azote organique pour donner, au premier passage, des croissances immédiates et des cultures denses [15, 11].

La souche de *B. mycoides* que nous avons étudiée ici croît bien dans un milieu synthétique qui contient du glucose et les cinq acides aminés : glutamate, alanine, valine, leucine, isoleucine.

Les effets d'inhibition et de désinhibition qui sont produits sur notre souche par des combinaisons variées de valine, leucine et isoleucine à diverses concentrations, sont analogues à ceux qui ont été observés sur *B. anthracis* par Gladstone [5], et étendus à d'autres microorganismes par des travaux récents [14, 21].

Wiame et Storek [22] avec des souches de *B. subtilis* mettent en évidence un allongement du temps de latence en présence de norvaline, d'acide α -aminobutyrique, d'isoleucine ou de leucine ; l'effet de la norvaline peut être compensé par une concentration accrue de glutamate.

Nous montrons ici également l'importance du glutamate à concentration élevée pour vaincre les inhibitions causées par les autres acides aminés du milieu.

L'alanine est pour notre souche, dans une première période de culture, un facteur limitant de la croissance.

Knight et Proom [41] ont décrit une souche aberrante de *B. subtilis* qui ne peut croître sur ammoniacale seule, mais qui croît en présence d'acides aminés parmi lesquels l'alanine et l'aspartate ; l'omission d'alanine dans ces conditions empêche la croissance au moins jusqu'à quatre-vingt-seize heures.

Avec la souche de *B. cereus* étudiée par Foster et Heiligman [3], la croissance totale à soixante-douze heures est à peu près la même en présence ou en absence d'alanine. Mais la sporulation est nulle ou presque en présence d'alanine : cela conduit ces auteurs à voir dans la sporogénèse un processus indépendant de la croissance, et dans l'alanine un inhibiteur spécifique de ce processus. Ils observent d'autre part que l'alanine n'inhibe pas la sporulation des souches de *B. lacticola*, *B. mycoides*, *B. megaterium* et *B. lactis*.

Les résultats que nous avons obtenus avec la souche de *B. mycoides* étudiée ici, sont différents : ce n'est pas la présence de l'alanine qui inhibe la sporulation, mais l'épuisement ou l'absence de l'alanine qui la provoque.

En effet, nous avons montré que la sporulation se produit en présence d'alanine si quelque autre facteur la provoque : par exemple, pour notre souche, l'épuisement ou l'absence de valine, leucine, isoleucine, à la fois.

Foster et collaborateurs [7, 8, 4] ont poursuivi des recherches très intéressantes sur la sporulation produite lorsqu'on remet des bacilles lavés en suspension dans l'eau distillée. Il convient de remarquer qu'on soumet alors des bacilles à de multiples pénuries qui peuvent ne pas prendre effet toutes en même temps ; la première à intervenir est sans doute celle de l'aliment carboné. Les auteurs observent en effet que l'addition de glucose aux suspensions de *B. mycoides* ou d'autres bacilles, empêche complètement la sporulation, mais qu'en présence d'ammoniacale, la sporulation n'est plus complètement supprimée ; ils attribuent à l'ammoniacale une action d'épargne vis-à-vis des réserves azotées qui fournissent les précurseurs du matériel de la spore [7]. Nous suggérons que peut-être la présence de glucose et d'ammoniacale permet à cette souche une croissance résiduelle avec assimilation des réserves azotées antérieurement élaborées, et que les pénuries qui s'établissent ainsi vis-à-vis d'acides aminés difficilement synthétisés entraînent la sporulation.

Il nous semble que l'interprétation des faits donnée par Foster et collaborateurs est plus soucieuse du mécanisme biochimique de la sporogénèse que de son déterminisme.

Certes, la sporogénèse est un processus métabolique complexe [20, 7, 8, 4], et elle ne peut être menée à bien que dans

des conditions qui ne lèsent pas les systèmes enzymatiques, et qui fournissent les substrats nécessaires.

Mais il y a lieu de souligner que le bacille où se forme la spore est un bacille qui cesse de se diviser.

Tout arrêt de la croissance n'entraîne pas la sporulation, mais toute sporulation implique l'arrêt de la croissance dans le bacille qui la subit, sinon dans la culture elle-même.

L'exemple de la souche étudiée ici montre que cet arrêt de la croissance peut n'être que provisoire. La question se pose à ce sujet de savoir si les spores peuvent germer dans le milieu même où elles se sont formées, ou si ce sont quelques bâtonnets ayant échappé à la sporulation qui reprennent leur croissance.

Quoi qu'il en soit, il nous apparaît que les conditions de sporulation sont pour chaque souche en relation avec les besoins nutritifs plus ou moins stricts qui commandent le taux et les limitations de la croissance.

CONCLUSIONS.

Nous avons établi pour une souche de *B. cereus* var. *mycoides* une formule de milieu synthétique dans lequel la croissance se poursuit végétativement sans être précocement limitée ; ce « milieu témoin » contient : sels minéraux, glutamate, alanine, valine, leucine, isoleucine et glucose.

Nous avons fait varier les concentrations initiales des cinq acides aminés, et nous en avons suivi l'utilisation pour étudier leurs effets sur la croissance et la sporulation.

La concentration relativement élevée du glutamate dans le milieu témoin, hâte le départ des cultures en contre-balançant les effets inhibiteurs dus aux autres acides aminés, et permet ensuite leur utilisation plus rapide. Mais le glutamate lui-même est à peine utilisé jusqu'à une période tardive de la culture.

En absence d'alanine, ou après épuisement d'une faible concentration initiale, la croissance est interrompue et une sporulation générale se produit. Plus tard la croissance reprend aux dépens des acides aminés qui restent présents.

En absence de valine, de leucine et d'isoleucine à la fois, la croissance est également interrompue, et la sporulation se produit, alors que glutamate, alanine et glucose demeurent en excès. Plus tard, la croissance reprend aux dépens de l'alanine d'abord, puis du glutamate.

Ainsi la souche étudiée finit par surmonter les pénuries en acides aminés. Mais la sporulation est associée aux paliers de la croissance, et apparaît encore comme la réponse d'un bacille sain à l'épuisement de certains facteurs limitants.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. R. BREWER, W. G. CULLOUGH, R. C. MILLS, W. G. ROESSLER, E. J. HERBST et A. F. HOWE. *Arch. Biochem.*, 1946, **10**, 65.
- [2] K. M. CLEGG, E. KODICEK et S. P. MISTRY. *Biochem. J.*, 1952, **50**, 326.
- [3] J. W. FOSTER et F. HEILIGMAN. *J. Bact.*, 1949, **57**, 639.
- [4] J. W. FOSTER et J. J. PERRY. *J. Bact.*, 1954, **67**, 295.
- [5] G. P. GLADSTONE. *Brit. J. exp. Path.*, 1939, **20**, 189.
- [6] N. GRELET. *Ces Annales*, 1951, **81**, 430 ; 1952, **82**, 66 et 310 ; 1952, **83**, 71.
- [7] W. A. HARDWICK et J. W. FOSTER. *J. gen. Physiol.*, 1952, **35**, 907.
- [8] W. A. HARDWICK et J. W. FOSTER. *J. Bact.*, 1953, **65**, 355.
- [9] G. M. HILLS. *Biochem. J.*, 1949, **45**, 363.
- [10] G. M. HILLS. *J. gen. Microbiol.*, 1950, **4**, 38.
- [11] B. C. J. G. KNIGHT et H. PROOM. *J. gen. Microbiol.*, 1950, **4**, 508.
- [12] J. F. POWELL. *J. gen. Microbiol.*, 1950, **4**, 330.
- [13] M. ROCKENMACHER, H. A. JAMES et S. S. ELBERG. *J. Bact.*, 1952, **63**, 785.
- [14] D. ROWLEY. *J. gen. Microbiol.*, 1953, **9**, 37.
- [15] N. R. SMITH, R. E. GORDON et F. E. CLARK. *U. S. Depart. Agric. Monograph n° 16*, 1952.
- [16] M. SOMOGYI. *J. biol. Chem.*, 1952, **195**, 19.
- [17] B. T. STEWART et H. O. HALVORSON. *J. Bact.*, 1953, **65**, 160.
- [18] H. L. A. TARR. *J. Hyg.*, 1932, **32**, 535.
- [19] C. B. THORNE, C. G. GOMEZ, G. R. BLIND et R. D. HOUSEWRIGHT. *J. Bact.*, 1953, **65**, 472.
- [20] R. TINELLI. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **235**, 836 ; 1954, **238**, 1622.
- [21] M. R. WASHBURN et C. F. NIVEN. *J. Bact.*, 1948, **55**, 769.
- [22] J. M. WIAME et R. STORCK. *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, **10**, 268.
- [23] O. B. WILLIAMS et O. F. HARPER Jr. *J. Bact.*, 1951, **61**, 551.
- [24] A. J. WOIWOD. *J. gen. Microbiol.*, 1949, **3**, 312.
- [25] B. E. WRIGHT. *J. Bact.*, 1953, **66**, 407.

VARIANTES BIOCHIMIQUES DE *S. MIAMI* ET *S. SENDAI* ÉTUDE DE L'ANTIGÈNE a

par L. LE MINOR (*).

(Institut Pasteur, Paris.)

Salmonella sendai et *Salmonella miami* possèdent selon le schéma de Kauffmann-White, la même structure antigénique : 1, 9, 12 : a : 1,5. Le diagnostic différentiel entre ces deux types repose uniquement sur leurs propriétés biochimiques. Selon Kauffmann [3] : *S. sendai* fait fermenter le xylose en quatre à dix jours, le rhamnose en un à quinze jours, l'arabinose en un jour. Le dulcitol n'est que tardivement et irrégulièrement fermenté. En milieu de Stern-glycérol il n'y a pas de production d'aldéhyde ; le *d*-tartrate de sodium n'est pas fermenté. Enfin *S. sendai* ne produit pas d'hydrogène sulfuré et ne cultive pas sur milieu de Simmons au citrate de sodium.

S. miami fait fermenter le xylose et le rhamnose en un jour et est sans action sur l'arabinose. Le dulcitol n'est jamais fermenté, le milieu de Stern-Glycérol vire rapidement au violet. Le *d*-tartrate de sodium peut être exceptionnellement attaqué, tardivement. *S. miami* produit en abondance de l'hydrogène sulfuré et cultive sur milieu de Simmons au citrate de Na.

Or, aucune des souches possédant les antigènes 1, 9, 12 : a : 1,5 que nous avons identifiées dernièrement ne possède les caractères biochimiques classiques de *S. miami* ou *S. sendai*.

SOUCHES ÉTUDIÉES. — D : hémoculture Hanoï (Indochine), adressée par le Dr Kirsche.

3663 : hémoculture Hanoï ((Indochine), adressée par le Dr Kirsche.

1-53 : coproculture Tunis (Dr Huet).

1-54 : coproculture Paris.

139-284-285 : coprocultures Maracaïbo (Venezuela), adressées par le Dr Fossaert.

Quand nous avons fait part de nos difficultés pour classer ces

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 octobre 1954.

souches à F. Kauffmann, il nous a dit avoir aussi rencontré deux souches atypiques :

153/53 et 328/53 provenant l'une du laboratoire vétérinaire, l'autre du laboratoire médical de Stanleyville (Congo belge).

F. Kauffmann nous a adressé ces souches pour notre étude comparative, ainsi que les souches types de *S. sendai* (71), *S. miami* (187), *S. loma-linda* (166) et une *S. loma-linda* biochimiquement atypique : 101/53.

TABLEAU I. — Propriétés biochimiques.

	Sendai type	D	3666	Sendai type	135 53	328 53	1/53	1/54	139	284	285	Loma- linda type	101 53
Arabinose	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Rhamnose	+3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	+6	+7	+7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Stern- glycérol	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
d-tertrate	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Citrate	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Milieu synthétique	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Antigène a	a ₁ a ₂ a ₄	a ₁ a ₂ a ₄	a ₁ a ₂ a ₄	a ₁ a ₂ a ₃	a ₁ a ₂ a ₄	a ₁ a ₂ a ₄	a ₁ a ₃	a ₁ a ₃	a ₁ a ₃	a ₁ a ₃	a ₁ a ₃	a ₁ a ₂ a ₄	a ₁ a ₂ a ₄

PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES. — Nous ne mentionnons que les réactions ayant un intérêt dans le diagnostic différentiel, les autres correspondant aux caractères généraux des *Salmonella*. Nos résultats sont rapportés dans le tableau I.

+ signifie virage en un jour, +³ en trois jours, etc.

— signifie pas de modification en douze jours.

En plus des épreuves biochimiques classiques, nous avons ensemencé nos souches sur un milieu synthétique décrit par Fukumi et coll. [2]. Sur ce milieu, *S. sendai* ne pourrait utiliser SO₄ comme source de S, contrairement à *S. miami*.

Ce milieu est ainsi composé :

Glucose	0,2 g
NaCl	0,5 g
SO ₄ Mg	0,02 g
SO ₄ (NH ₄)H ₂	0,1 g
PO ₄ K ₂ H	0,1 g
Eau distillée	100 cm ³

S. miami cultive sur ce milieu, tandis que *S. sendai* exige la présence de cystéine, cystine ou méthionine.

Nous avonsensemencé le milieu ainsi préparé à partir d'une culture sur gélose. Les résultats sont rapportés dans le tableau I, + indiquant la culture, — l'absence de culture.

Notons enfin que, conformément aux observations de Aoki [4], de Fournier et Chouw [5], toutes nos souches étaient gazogènes.

STRUCTURE ANTIGÉNIQUE. — Nous avons étudié essentiellement l'antigène H phase 1.

L'étude de l'antigène O : 1 n'a qu'un intérêt secondaire depuis que Kauffmann a montré les variations qui peuvent se produire dans l'agglutinabilité de cet antigène. Les agglutinations que nous avons observées dans le sérum O : 1, 3, 19 (au 1/10, sur lame) ne permettent donc guère de conclure. Signalons simplement que les souches D, 284, 285, 1/54, 1/53, 101/53, *S. miami* et *S. sendai* types y ont été franchement agglutinées, les autres souches n'ayant donné sur lame qu'un résultat douteux.

ANTIGÈNE H. — Les souches possédant les antigènes a en phase 1 étaient agglutinées au titre de 1/25 600 dans un sérum anti-*S. paratyphi* A. Les phases 2 (1,5) étaient agglutinées au même titre dans un sérum anti-1,5 préparé avec *S. cholerae suis* var. *kunzendorf* et sur lame par le sérum anti-5 saturé.

Nous avons préparé cinq sérums sur lesquels nous avons pratiqué des saturations croisées :

S. miami type ;

S. sendai type ;

Une souche atypique de ce groupe : nous avons choisi 1/53 ;

S. loma-linda type ;

S. 101/53 (*S. loma-linda* atypique).

Les souches injectées étaient diphasiques.

Les titres d'agglutination des phases 1 et 2 étaient de 1/12 800 à 1/25 600, sauf dans le sérum anti-*S. sendai*. Ici le titre d'agglutination des phases 1 n'était que de 1/3 200 à 1/6 400.

PHASE 1. — Les saturations et les agglutinations ont été faites au moyen de phases 1 pures obtenues par culture en présence de sérum anti-1,5. Les suspensions n'étaient pas agglutinées par un sérum anti-1,5 préparé avec *S. cholerae suis* var. *kunzendorf*, dilué au 1/100.

Nous rapportons dans le tableau II les résultats des saturations croisées.

Signalons en plus des résultats rapportés dans ce tableau que :

1° Les agglutinines restant dans le sérum anti-*S. miami* saturé par 1/53 sont saturées par *S. paratyphi* A.

2° Si on sature le sérum anti-*S. miami* par *S. paratyphi* A, on a les mêmes résultats qu'en saturant par *S. sendai*. Ces agglutinines restantes disparaissent lors d'une nouvelle saturation par 1/53.

3° Les agglutinines subsistant dans le sérum anti-*S. sendai* après saturation par 1/53 disparaissent lors d'une nouvelle saturation par *S. paratyphi* A.

4° Il en est de même pour les agglutinines restant dans le sérum anti-*S. sendai* saturé par *S. miami*.

TABLEAU II

saturé par	Sérum <i>S. miami</i>		Sérum <i>S. sendai</i>		Sérum 1/53	
	1/53	<i>S. sendai</i>	1/53	<i>S. miami</i>	<i>S. miami</i>	<i>S. sendai</i>
<i>S. miami</i>	400	800	400	0	0	800
<i>S. sendai</i>	200	0	800	200	0	0
<i>S. para</i> A	200	0	800	200	0	0
1/53	0	800	0	0	0	1.600
D	200	0	800	200	0	0
3566	200	0	800	200	0	0
284	0	400	0	0	0	1.600
285	0	400	0	0	0	800
1/54	0	400	0	0	0	1.600
139	0	400	0	0	0	800
135	100	0	400	200	0	0
328	100	0	400	200	0	0
<i>S. L. linda</i>	200	0	200	200	0	0
101/53	200	0	400	200	0	0

5° Les agglutinines restant dans le sérum anti-1/53 après saturation par *S. sendai* disparaissent en y ajoutant *S. miami* type.

6° La saturation du sérum anti-1/53 par *S. paratyphi* A donne les mêmes résultats que la saturation par *S. sendai*.

7° Le sérum anti-*S. sendai* est complètement saturé par *S. paratyphi* A.

Les antigènes a de *S. sendai* et *S. paratyphi* A semblaient donc identiques. Nous l'avons contrôlé par la contre-expérience rapportée dans le tableau III.

Les *S. miami* atypiques paraissent donc semblables dans la phase I de leur antigène H, sauf les souches 135 et 328. Afin de nous assurer de la particularité de ces deux souches, nous les avons utilisées pour saturer les sérums anti-*S. sendai*, *miami* et 1/53 (tableau IV).

Pour les souches *S. loma-linda* et 101/53, la question est simple : les saturations des agglutinines anti-a de ces sérums

par *S. paratyphi* A et d'un sérum anti-*S. paratyphi* A par ces souches est totale.

TABLEAU III. — Saturations du sérum anti-*S. paratyphi* A par *S. miami*, 1/53, *S. sendai*.

	<i>S. miami</i>	1/53	<i>S. sendai</i>
<i>S. miami</i>	0	100	0
1/53	0	0	0
<i>S. sendai</i>	3.200	3.400	0
Para A	3.200	3.200	0
135	1.600	1.600	0
328	1.600	3.200	0

TABLEAU IV

Saturation par	135			328		
Sérums	Miami	1/53	Sendai	Miami	1/53	Sendai
135	0	0	0	0	0	0
328	0	0	0	0	0	0
Miami	400	800	0	400	1.600	0
1/53	400	400	0	400	800	0
Sendai	0	0	0	0	0	0
Para A	0	0	0	0	0	0
Saturés par	1/53	Miami		1/53	Miami	
Miami	0	0		0	0	
1/53	0	0		0	0	

INTERPRÉTATION. — L'antigène a doit être divisé en plusieurs facteurs, dont le plus important, que nous dénommerons a_1 , est le facteur commun.

1° Possèdent les antigènes a_1 , a_2 , a_4 : *S. sendai*, *S. paratyphi* A, 135, 328, D, 3 666, *S. loma-linda*, 101/53 ;

2° Possède les antigènes a_1 , a_2 , a_3 : *S. miami* type ;

3° Possèdent les antigènes a_1 , a_3 : 1/53, 284, 285, 1/54, 139.

Ceci correspond à l'observation de Edwards et Moran [1] qui signalaient, dans l'article où ils décrivaient *S. miami*, que son antigène a est différent de celui de *S. paratyphi* A, mais que celui de *S. sendai* est identique à ce dernier.

Il nous a semblé intéressant de voir si la structure de l'antigène a, que nous avions trouvé chez notre *S. paratyphi* A type, se retrouvait chez d'autres souches. Nous avons examiné dix souches de provenance variée (France, Indochine, Turquie) : cinq H_2S positives et cinq H_2S négatives. Nous avons mis ces suspensions H en présence des sérums anti- a_2 (sérum anti-

S. miami saturé par 1/53), a_3 (sérum anti-*S. miami* saturé par *S. sendai* et sérum anti-1/53 saturé par *S. sendai*), a_4 (sérum anti-*S. sendai* saturé par *S. miami*) $a_2 + a_4$ (sérum anti-*S. sendai* saturé par 1/53). Toutes nos souches se sont comportées de façon semblable : les suspensions furent agglutinées par les sérums anti- a_2 , $a_2 + a_4$, a_4 , mais ne furent pas agglutinées par le sérum anti- a_3 . Il en fut de même pour la souche type de *S. paratyphi* A var. *durazzo*. La structure antigénique de l'antigène H de *S. paratyphi* A paraît donc homogène chez les diverses variétés : a_1 , a_2 , a_4 .

Nous avons étudié de même les phases 1 de quelques autres *Salmonella* de la collection du Centre International de Copenhague, possédant l'antigène a.

Les souches suivantes se comportent comme *S. paratyphi* A et *S. sendai* (antigènes a_1 , a_2 , a_4) : *S. 4,5* : a : 1,5, *S. kisan-gani*, *S. tinda*, *S. bispebjerg* (groupe B), *S. oslo*, *S. san Juan*, *S. austin*, *S. denver* (groupe C₁), *S. narashino*, *S. curacao* (groupe C₂), *S. oxford* (groupe E), *S. luciana*, *S. marseille* (groupe F), *S. brazil* (groupe I), *S. berkeley* (0 : 43).

S. arechavaleta (groupe B) se comporte comme *S. miami* type : la suspension H phase 1 est agglutinée par les sérums anti- a_2 et a_3 . Elle contient les antigènes a_1 , a_2 , a_3 .

S. durban (groupe D) se comporte comme les *S. miami* atypiques et l'antigène a ne contient que les facteurs a_1 et a_3 .

A l'exception des souches de *S. sendai* et de *S. paratyphi* A, toutes les souches que nous avons mentionnées ont cultivé sur le milieu synthétique de Fukumi.

PHASE 2. — Celle-ci est encore plus complexe que la phase 1. En travaillant uniquement avec *S. miami*, 1/53, *S. sendai*, *S. cholerae* suis, *S. muenster* et *S. thompson*, nous avons dû fractionner en six l'antigène 1,5 : toutes ces souches étaient différentes dans leur phase 2. Ce travail n'ayant guère d'intérêt pratique, nous avons abandonné l'étude de la phase 2.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

Le diagnostic différentiel entre *S. sendai* et *S. miami* repose uniquement sur des caractères biochimiques. Or les souches du groupe D possédant les antigènes H : a et 1,5 que nous avons étudiées ne peuvent être rangées ni dans un type ni dans l'autre. Deux souches d'Indochine se différencient de *S. sendai* type par leur production d'H₂S. Sept autres se différencient de *S. miami* par leur attaque en un jour de l'arabinose et du dulcitol.

Nous espérons que l'étude antigénique de la phase 1 nous permettrait de mettre en évidence des différences nettes. Or le résultat n'est que partiel.

Les souches D et 3 666, qui se différencient de *S. sendai* uniquement par la production d' H_2S , possèdent le même antigène a que *S. sendai* type et *S. paratyphi* A : a_1, a_2, a_4 .

Les souches qui se différencient de *S. miami* type par l'attaque de l'arabinose et du dulcitol ne possèdent pas un antigène a identique : *S. miami* type possède a_1, a_2, a_3 , les souches atypiques de Paris, Tunis, Venezuela : a_1, a_3 , les deux souches atypiques du Congo belge transmises par F. Kauffmann a_1, a_2, a_4 . Ces dernières possèdent donc le même antigène a que *S. sendai* et *S. paratyphi* A.

S. loma-linda type et une variante dulcitol positive possèdent un antigène a identique à celui de *S. paratyphi* A et *S. sendai*.

En conclusion :

Pour *S. loma-linda*, qui est la seule espèce du groupe D à posséder les antigènes a-e, n, x, la fermentation du dulcitol doit être considérée comme variable.

Pour *S. miami* et *S. sendai*, deux solutions sont possibles :

— ou rassembler ces deux espèces sous un même nom : le type serait alors arabinose, dulcitol, xylose, glycérol, H_2S , d-tartrate, culture sur citrate et milieu synthétique variables, ce qui serait assez confus,

— ou conserver les deux dénominations, ce qui nous semble préférable. Pour *S. sendai* (qui ne cultive pas sur milieu synthétique de Fukumi), il faudrait remplacer le caractère H_2S : — par H_2S : V. Pour *S. miami* (toutes les souches rangées sous ce nom que nous avons étudiées cultivent en milieu de Fukumi), les caractères arabinose et dulcitol —, d-tartrate (X) devraient être remplacés par V. Ceci permettrait de considérer les souches arabinose et dulcitol positives comme des variantes biochimiques. Parmi celles-ci il existe dans l'antigène a deux variantes : a_1-a_3 et $a_1-a_2-a_4$.

Note. — Depuis la rédaction de cet article, nous avons examiné dix autres souches que nous a adressées P. R. Edwards que nous remercions.

Toutes ces souches cultivent sur milieu synthétique de Fukumi.

Neuf d'entre elles, étiquetées *S. miami*, ne font fermenter ni l'arabinose, ni le dulcitol, font fermenter en un jour le rhamnose et le xylose, font virer en vingt-quatre heures le milieu de Stern-glycérol, produisant de l' H_2S et cultivent sur milieu de Simmons au citrate. Elles sont d-tartrate négatives.

Leur phase 1 est agglutinée par les sérums saturés anti- a_2 et a_3 . Ces 9 souches se comportent donc, tant au point de vue biochimique qu'au point de vue de leur antigène « a » comme *S. miami* type.

Une souche étiquetée 9:a:1,5 (CDC 1544/54) se rapproche de nos *S. miami* atypiques : elles acidifie les milieux à l'arabinose, au rhamnose, au xylose, fait virer le milieu de Stern-glycérol, cultive sur

citrate et est *d*-tartrate positive. Elle en diffère toutefois par le fait que le milieu au dulcitol, au lieu d'être acidifié en un jour reste inchangé en cinq jours. Cette souche n'est pas agglutinée par les sérums anti-a₂ et a₄, mais uniquement par le sérum anti-a₃.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. R. EDWARDS et A. B. MORAN. *J. Bact.*, 1945, **50**, 257.
- [2] H. FUKUMI, E. SAYAMA et R. NAKAGA. *Jap. J. med. Sci.*, 1953, **6**, 327.
- [3] F. KAUFFMANN. *Enterobacteriaceae*. E. Munksgaard, Copenhague, 1951 et 1954.
- [4] K. AOKI. *Zbl. Bakt.*, 1933, **128**, 459.
- [5] J. FOURNIER et K. C. CHOUW. *J. Shanghai Sci. Inst.*, 1941, **4**, 17.

LA CULTURE DES MYCOBACTÉRIES SUR GÉLOSE NUTRITIVE. SON INTÉRÊT RELATIF POUR DIFFÉRENCIER LES BACILLES TUBERCULEUX ET PARATUBERCULEUX

par H. BOISVERT (*).

(Institut Pasteur, Laboratoires de Recherches
sur la Tuberculose [Chef de Service : J. BRETEY].)

Depuis la publication par Borrel en 1904, de *Bacilles tuberculeux et paratuberculeux* [1], il est devenu classique d'opposer la facilité avec laquelle les bacilles paratuberculeux se développent sur les milieux de culture usuels, à l'impossibilité d'obtenir une semblable culture à partir des bacilles pathogènes pour l'homme. Dès 1903, Moeller [2] avait préconisé pour l'identification des bacilles paratuberculeux, la culture à 30° en bouillon ordinaire pendant quarante-huit heures avec repiquage sur gélose.

En 1950, au cours d'un essai poussé d'identification, nous avons essayé de cultiver sur gélose ordinaire plusieurs souches de mycobactéries témoins. Les constatations que nous avons pu faire alors, nous ont incité à élargir le champ de nos observations et à vérifier ainsi la valeur comme test différentiel, de la culture sur gélose à 37°.

TECHNIQUE.

Nous entendons par gélose nutritive, gélose ordinaire ou simplement gélose, le milieu de culture constitué par du bouillon de viande peptoné, solidifié par la gélose et possédant un pH neutre ou légèrement alcalin. Des échantillons provenant de plusieurs laboratoires ont été utilisés, sans attirer de remarques particulières. La présence dans chaque tube de quelques gouttes d'eau de condensation est d'une grande importance.

Il eût été préférable d'ensemencer avec des cultures pesées et homogénéisées, mais, d'une part le développement sur gélose à partir d'une suspension aqueuse est déjà aléatoire avec 1/10 de milligramme et le même phénomène s'observe d'ailleurs avec la pomme de terre ensemencée avec des bacilles en milieu de Dubos

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 octobre 1954.

au Tween 80, d'autre part la culture, parfois très pauvre, obtenue sur gélose, ne se prête pas toujours aux manipulations nécessaires.

Aussi l'ensemencement a-t-il lieu avec un fil de platine ou une petite spatule. Un petit grain de la culture mère, correspondant à 1/10 de milligramme environ, est soigneusement dissocié dans l'eau de condensation d'une nouvelle gélose et étalé par friction. Il est évident que, malgré toute l'attention apportée à ce détail, la semence s'accumulera en certains points où se manifesteront de préférence les colonies bactériennes. Un second tube reçoit 1 mg environ du même inoculat.

Les cultures sont repiquées de la même façon tous les mois en principe. On effectue une dizaine de passages au moins, afin d'éliminer l'influence du milieu de culture primitif, plus favorable, et de vérifier les possibilités d'adaptation ou de dissociation des souches microbiennes.

Nous avons, par cette méthode, entrepris la culture d'un certain nombre de souches appartenant à diverses espèces de mycobactéries dont le comportement est exposé ci-dessous.

« MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS HOMINIS ».

En 1884, Robert Koch [3], qui utilisait une gélose acide, avait constaté la grande difficulté de cette culture. A. Vaudremer, de 1921 à 1926, avait obtenu à partir d'une souche humaine virulente des cultures en série se développant en huit jours ; au dixième repiquage, la souche avait perdu son alcool-acido-résistance et sa virulence, et devait récupérer ce premier caractère après un passage sur milieu au sérum ou à la glycérine [4] ; l'auteur aurait même observé, dans certaines conditions, des cultures de bacilles cyanophiles apparaissant en vingt-quatre heures [5].

M. van Riemsdijk, en 1953 [6], a étudié pendant dix-sept mois 11 cultures sur gélose de bacilles nouvellement isolés. Elle a observé 5 types différents de colonies et considère les variations survenues durant cette période comme les manifestations d'un cycle évolutif ; les bacilles étaient plus petits que sur pomme de terre. En 1935, E. Grasset [7], qui a entrepris lui aussi l'étude du cycle évolutif, a obtenu avec des bacilles virulents et du BCG des cultures sur gélose de bacilles cyanophiles mêlés à quelques éléments fuchsiphiles ; il aurait repiqué aisément ces micro-organismes tous les deux ou trois jours au cours de 120 passages. Un important travail a été publié en 1952 par A. Imamura [8]. Depuis 1928, il a cultivé 107 souches, d'abord sur gélose glycélinée, puis, à partir de 1934, sur gélose sans glycérine ; en 1952, il restait 30 souches à leur cent trente-cinquième passage sur gélose ordinaire. Les bacilles étaient plus courts que la normale, mais

pouvaient recouvrer leur taille, l'a. a. r. était légèrement diminuée, trois souches possédaient une virulence stabilisée comparable à celle du BCG, les autres gardaient un certain pouvoir pathogène.

SOUCHES DE COLLECTION. — Nous avons étudié 14 souches entretenues sur milieu de Jensen (1) ou de Lœwenstein (H37Rv, Brévannes, Peurois, Lesné, H512, Libourne, Frankfurt, CCH, Congo B), dont 5 classées comme avirulentes (H37Ra, HB42, H₄, JB6, JB16).

Le passage du milieu à l'œuf sur la gélose se fait sans difficulté. La première culture est plus importante en général que les suivantes et nous n'avons pas observé d'adaptation après 19 passages ; il semble même que les cultures deviennent de plus en plus difficiles à obtenir.

Les colonies se développent parfois dès le cinquième jour mais en général vers le douzième ou quinzième. La culture se présente sous trois formes : 1° Culture en nappe mince recouvrant toute la surface ensemencée. Cet aspect se présente surtout lors du premier passage sur gélose, il correspond à notre avis à la culture en gazon ras qui suit sur Jensen un inoculat important de l'ordre du 1/10 mg ; les colonies sont tellement nombreuses qu'elles n'arrivent pas à s'épanouir. 2° Colonies rugueuses, blanc écru, bourgeonnantes, en chou-fleur, aussi larges et même plus larges au sommet qu'à la base, parfois en couronne. C'est la forme habituelle sur les milieux à l'œuf mais les colonies sont ici plus petites. 3° Colonies plus étalées, en monticule, avec un centre culminant et une base s'étalant irrégulièrement. Ce type est moins fréquent sur les milieux classiques, il se rapproche en moins plat de celui qu'on observe sur la gélose de Dubos. En définitive, les cultures sur gélose sont caractéristiques et aisément identifiables.

La richesse de la culture est très variable pour un même ensemencement. A côté de la forme en nappe, on rencontre de nombreuses petites colonies, puis celles-ci deviennent de moins en moins nombreuses en même temps que leur taille s'accroît pour atteindre celle d'une colonie moyenne sur Jensen ; elles peuvent aussi rester très petites. En général, la culture se borne à quelques colonies assez bien développées.

SOUCHES DE PRIMOCULTURE. — 21 souches ont été ensemencées sur gélose à partir du tube d'isolement (Jensen ou

(1) Nous appelons milieu de « Jensen » le milieu à l'œuf décrit par K. A. Jensen (*Zentralbl. Bakt.*, 1932, **125**, 222) et souvent dénommé d'une façon qui prête au quiproquo : Lœwenstein-Jensen ou même Lœwenstein tout court.

Loewenstein) ; 7 se sont développées comme les souches de collection, 13 ont présenté une première culture très pauvre et des subcultures normales, 1 ne s'est pas reproduite sur gélose.

ISOLEMENT SUR GÉLOSE. — 89 tentatives ont été faites à partir de produits pathologiques ou d'organes d'origine humaine ou animale traités par la soude : 62 expectorations, 3 urines, 1 liquide pleural et 23 organes de cobayes. Dans un seul cas la gélose ensemencée avec du pus traité de ganglion de cobaye tuberculeux, a donné des colonies tardives, rares et de petite taille, caractéristiques cependant. Cette souche entretenue sur gélose ne diffère pas morphologiquement de son homologue obtenue sur Jensen.

« MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BOVIS ».

A. Vaudremer [4] avait obtenu en six semaines une culture sur gélose de la souche Vallée qui avait perdu son a. a. r. mais était demeurée virulente pour le cobaye chez lequel on retrouvait les bacilles fuchsinophiles. Une souche d'origine bovine étudiée par van Riemsdijk [6] se comportait comme les souches d'origine humaine.

SOUCHES EUGONIQUES RUGUEUSES. — Deux souches de collection (Vallée, Dupray S) ainsi qu'une primoculture (Isel R) nous ont montré les mêmes caractères que les souches humaines. Le BCG se montre un peu moins vivace.

SOUCHES DYSGONIQUES LISSES. — Huit souches ont été étudiées (1033, 1099, 2002, 2018, CCB, Isel S, Congo P, 2040). Isolées à des dates récentes, elles évoluent peu à peu, au fur et à mesure des repiquages massifs sur Jensen, du type dysgonique lisse pur vers un stade intermédiaire où la culture se développe bien sans avoir un caractère nettement rugueux.

Ces souches présentent une particularité intéressante : sur gélose elles se développent d'emblée sous une forme eugonique rugueuse et ne se différencient pas des cultures de bacilles humains. Le contraste est grand entre la culture sur Jensen qui parfois se réduit à une simple décoloration du milieu et la culture relativement riche sur gélose qui peut atteindre 30 à 40 mg, poids humide, par tube de 16 × 17. Repiquées sur Jensen, ces colonies rugueuses redonnent des colonies lisses semblables à celles de la souche homologue entretenue sur Jensen et le passage sur gélose ne semble pas accélérer l'évolution vers le stade intermédiaire.

Il faut noter que les souches bovines dysgoniques lisses se développent sur gélose de Dubos sous la forme de colonies trans-

parentes, irrégulières (Calmels et Boisvert) [9] et qu'en milieu de Youmans ou de Dubos sans Tween 80 elles donnent des cultures floconneuses comme le type humain classique.

ISOLEMENT SUR GÉLOSE. — Neuf essais à partir d'organes de lapins tuberculeux sont demeurés sans résultat.

Mycobacterium tuberculosis muris. — Les cultures obtenues avec la souche de collection LV 2492 sont assez pauvres.

Les souches appartenant à ces trois types ne s'adaptent pas vraiment à la gélose, la culture reste toujours précaire et au bout d'un certain nombre de repiquages les ensemencements peuvent demeurer stériles.

Mycobacterium tuberculosis avium. — Borrel [4] indique que les bacilles aviaires se développent rapidement sur les milieux usuels et l'on sait depuis Straus [10] que leur isolement est possible sur gélose nutritive.

Les 7 souches de collection que nous avons étudiées appartenaient au type eugonique lisse (A 869, AT 3, Lafon, A 293, A 17, Senthille, 1034). Elles ne nous ont pas donné des cultures aussi précoces ni aussi luxuriantes que nous l'attendions. Cependant le caractère constamment lisse de ces cultures rend parfois l'observation assez difficile.

Nous n'avons pu observer assez longtemps 4 primocultures effectuées à partir d'organes de faisan (Fa 1, Fa 2, Fa 3, Fa 4) par le D^r Lucas. Même sur Jensen elles ne se développent pas avant une semaine et le deuxième passage sur gélose a donné des cultures tardives, pauvres et même nulles.

Contrairement aux bacilles bovins lisses, les bacilles aviaires lisses gardent ce caractère sur gélose et en milieux liquides de Youmans ou Dubos sans Tween 80 les cultures sont homogènes.

« BACILLES PARATUBERCULEUX ».

Dans ce groupe, nous faisons entrer un grand nombre d'espèces : *piscium*, *phlei*, *smegmatis*, *berolinensis*, *graminis*, etc. et des souches difficiles à classer : Courmont, Chauviré.

Dans l'inventaire des bacilles paratuberculeux de P. Hauduroy [41] sont mentionnées 227 souches se développant à 37° sur gélose ordinaire, 28 ne s'y multiplient pas, 4 croissent mieux sur gélose ordinaire que sur gélose glycinée et 3 cultivent sur gélose ordinaire et non sur gélose glycinée. R. Sansonnens [42] étudiant 17 souches de collection, constate qu'elles se développent toutes à 37° sur gélose ordinaire, la plupart en deux, trois

jours ; mais 3 donnent une culture en moins de vingt-quatre heures, 8 de vingt-quatre à quarante-huit heures et 1 se manifeste très maigrement après dix jours. P. J. Coletsos [43] a souligné les difficultés de l'isolement des bacilles paratuberculeux à partir des produits pathologiques d'origine humaine ; même sur les milieux les plus favorables, l'apparition des colonies peut être tardive ; le traitement par la soude ou l'acide entrave ou annihile la culture sur les milieux ordinaires alors qu'elle se révèle encore quelquefois sur Lœwens'cin. A. Meyn [44] remarque que lorsqu'on ensemence le lait sur milieu à l'œuf, les bacilles paratuberculeux ne se distinguent des bacilles tuberculeux ni par l'aspect des colonies, ni par la vitesse de multiplication. On caractérise le plus souvent les paratuberculeux par repiquage ; les subcultures poussent rapidement sur les milieux ordinaires comme sur les milieux à l'œuf ; il existe cependant quelques rares souches qui ne cultivent même après repiquage que sur milieux à l'œuf et lentement.

Jensen [45] constate que lors des cultures en vue de l'isolement des B. K., quelques saprophytes poussent beaucoup plus rapidement que celui-ci mais que d'autres se développent aussi lentement que les bacilles tuberculeux humain et bovin.

Dans son important travail sur la classification des bacilles paratuberculeux, Penso [46] ne mentionne pas la culture sur gélose. De même H. C. Engbaeck [47] qui propose une méthode d'identification.

Nous avons étudié 34 souches de collection et 5 souches nouvellement isolées.

8 souches de collection (Grassberger, My 14, Thomoff, Pellegrini, Crottin, Vipère 27, Vipère 28, 4, 169) se développent sur gélose en moins de vingt-quatre heures, souvent plus rapidement que sur les milieux à l'œuf. D'autres entre vingt-quatre et quarante-huit heures (Milch-Möller, Darrier, Fléole, Saenz 19, Rabinovitch), mais certaines donnent une maigre culture après dix jours (BF 30, Ga 32, van Deinse 23, Kedrovsky, etc...).

Sur les 5 souches récentes, l'une cultive très facilement en deux, trois jours, son aspect est identique à celui d'un bacille tuberculeux (Tombret), 2 autres, lisses pigmentées en cinq à six jours (Martinkowitch, Ham), les 2 dernières, lisses pigmentées après dix jours, pauvrement et d'une façon irrégulière (Adam, Berg).

Pour toutes ces souches, les colonies sur gélose présentent les mêmes caractères rugueux ou lisses que sur milieu à l'œuf, seul le pouvoir chromogène est atténué.

Mycobacterium paratuberculosis johnei. — Deux souches

entretenues sur milieux à l'extrait de fléole n'ont pas donné de culture sur gélose.

Mycobacterium paratuberculosis ulcerans. — Un seul essai à 33° est demeuré sans résultat.

★ ★

Remarques :

1° *Sur la virulence des souches entretenues sur gélose*. — Nous n'avons étudié qu'une seule souche à cet égard : la souche bovine Isel. Isolée en avril 1952 d'un fragment de gaine synoviale tuberculeuse elle montrait sur Jensen des colonies dysgoniques lisses typiques, sur gélose de Dubos les colonies transparentes irrégulières que nous avons décrites et le repiquage sur gélose ordinaire donnait une culture eugonique rugueuse : sa virulence était grande pour le cobaye et le lapin.

Après huit passages sur Jensen, la culture avait quelque peu évolué vers le type intermédiaire ; à ce moment elle a été inoculée à deux lapins. La virulence était un peu diminuée ; la culture des organes a donné pour l'un des animaux des colonies dysgoniques lisses typiques seules, pour l'autre apparurent aussi de rares colonies eugoniques rugueuses.

Au dix-huitième passage sur Jensen la virulence de la souche en phase semi-rugueuse a été éprouvée comparativement avec la culture sur gélose de la même souche à son dix-neuvième passage. Pour le cobaye et le lapin, le pouvoir pathogène qui a baissé, est un peu plus faible avec la culture sur gélose.

Au vingt-troisième passage sur Jensen et au vingt-cinquième sur gélose, nouvelle vérification de la virulence. La suspension microbienne pratiquée directement à partir des cultures sur Jensen et gélose est inoculée au cobaye et au lapin à la dose élevée de 1/10 mg. Là encore, le pouvoir pathogène nettement atténué est un peu moins apparent avec les bacilles issus de la gélose. La culture des organes des lapins infectés avec la souche entretenue sur Jensen montre sur ce même milieu, en nombre à peu près égal, des colonies dysgoniques lisses et des colonies eugoniques rugueuses tout à fait typiques. La proportion des colonies de ce dernier type est moins élevée chez les lapins ayant reçu les bacilles développés sur gélose.

2° *Sur l'aspect microscopique comparé des mycobactéries cultivées parallèlement sur Jensen et sur gélose*. — Nous ne nous sommes pas livré ici à une étude systématique mais nous avons, lors des repiquages, effectué un certain nombre de frottis avec les souches entretenues simultanément sur gélose et sur Jensen. Une partie seulement des examens est rapportée ici. Les observations concernent la longueur et la coloration des bacilles cultivés sur gélose vis-à-vis de ceux qui se sont multipliés sur Jensen.

	a. a. r.	TAILLE
Bacilles tuberculeux	{ Diminuée. . . 14	{ Diminuée. . . 16
	{ Semblable . . 15	{ Semblable . . 13
	{ Augmentée . . 18	{ Augmentée . . 1
Bacilles paratuberculeux	{ Diminuée. . . 1	{ Diminuée. . . 5
	{ Semblable . . 10	{ Semblable . . 12
	{ Augmentée . . 12	{ Augmentée . . 4

★★

DISCUSSION.

Des travaux des auteurs et plus particulièrement de ceux d'Imamura [8] ainsi que de nos propres observations, il ressort que la culture en série des bacilles tuberculeux humain, bovin et murin est possible sur la gélose nutritive. Si l'aspect des colonies reste caractéristique et si elles apparaissent dans des temps à peu près normaux, il n'en est pas moins vrai que ce milieu se révèle peu sensible. Avec un inoculat important la culture, surtout facile avec les souches de collection, presque constante au premier repiquage des isoléments sur milieu à l'œuf, se montre extrêmement aléatoire à partir des produits pathologiques même richement bacillifères traités par la soude.

Le comportement des souches bovines dysgoniques lisses attire l'attention : sur gélose elles se développent d'emblée sous la forme rugueuse du type humain. S'agit-il d'une variation propre au milieu ou d'une dissociation ? Un ensemble de faits plaide pour la première hypothèse :

1° Même si la souche fraîchement isolée appartient au type dysgonique lisse pur, la culture sur gélose est rugueuse.

2° Cette culture repiquée sur Jensen redonne des colonies lisses.

3° Nous avons observé des variations reversibles analogues avec les milieux liquides sans produit mouillant ; la culture se manifeste sous la forme de flocons. Des constatations identiques sont rapportées par Jensen [15] en ce qui concerne les milieux de Petroff et de Besredka.

Les bacilles aviaires se distinguent nettement des bacilles bovins lisses par leur aspect constamment lisse sur gélose. Dans les milieux liquides sans Tween 80, ils se développent d'une manière homogène. En ce qui concerne les souches de collection, la culture se montre assez rapide, nettement plus lente et plus irrégulière avec les souches récentes. D'une façon générale, la croissance sur gélose des bacilles de ce type nous a paru moins luxuriante que nous le faisaient présager les auteurs.

Pour ce qui est des bacilles paratuberculeux, groupe très hétérogène, si dans certains traités et dans beaucoup d'esprits

il est acquis que leur culture sur gélose est aisée, les publications récentes relatent, à côté des souches se développant très vite sur gélose, d'autres se manifestant dans des délais aussi longs que les bacilles tuberculeux humain et bovin, et certaines ne cultivent pas sur ce milieu. Nos propres observations, malheureusement trop rares en ce qui concerne les souches récemment isolées, confirment pleinement celles des auteurs. Des variations de forme analogues à celle du bacille bovin lisse, n'ont pas été enregistrées. La pigmentation diminuée est plus difficile à apprécier que sur les milieux à l'œuf.

La culture sur gélose modifie-t-elle la virulence ? Vaudremer [4] et Imamura [8] ont signalé, l'un la perte de virulence d'une souche, l'autre la simple atténuation pour 30 souches après 135 passages.

Pour l'unique souche que nous avons étudiée, nous avons noté à deux reprises une moindre virulence de la souche sur gélose comparée à celle entretenue sur Jensen. Le pouvoir pathogène des deux cultures a baissé de façon parallèle. Les inoculations avaient été faites directement à partir des cultures lisses sur Jensen et rugueuses sur gélose, pesées et homogénéisées avec des billes de verre. A poids égal, la suspension issue du Jensen était deux fois plus trouble que celle fournie par la gélose. La première révélait des bacilles à peu près isolés et la seconde des amas parfois importants. Il semble bien que ces différences de comportement aient joué un rôle dans la dissémination des bacilles et par conséquent des lésions. La diminution de la virulence des bacilles entretenus sur gélose ne nous paraît donc pas évidente.

A moins d'une dissociation toujours possible, l'entretien des cultures de bacilles tuberculeux sur la gélose nutritive n'entraîne donc pas fatalement la perte du pouvoir pathogène.

L'aspect microscopique est-il modifié par l'entretien des souches sur gélose ?

Vaudremer [5] et Grasset [7] font mention de la perte d'ailleurs transitoire de l'a. a. r. pour des souches entretenues dans des conditions très particulières. Imamura [8] note une légère diminution ; pour lui et pour van Riemsdijk [6] les bacilles étaient plus courts.

De l'essai limité que nous avons effectué, il résulte que si l'a. a. r. et la taille des bacilles sont parfois diminuées, elles sont souvent conservées et même augmentées.

On ne saurait donc souscrire sans réserves à l'opinion que la culture des mycobactéries sur gélose engendre une diminution de la longueur et de la colorabilité.

Quelles conséquences pratiques tirer de ces observations ?

1° Il est possible à la rigueur, à défaut de milieux plus favorables, d'entretenir des bacilles tuberculeux sur gélose, cependant on court le risque de perdre la souche.

2° Elle pourrait être utilisée comme milieu d'enrichissement pour les souches bovines lisses, mais la forme rugueuse n'est pas favorable aux manipulations bactériologiques.

3° C'est en réalité comme milieu différentiel des bacilles tuberculeux et paratuberculeux que la culture sur gélose offre quelque intérêt. En fait, dans maint laboratoire, avant d'entreprendre des recherches plus approfondies : inoculation, sensibilité au PAS et à l'INH, températures limites, bactériophages, etc., on est porté à faire un repiquage sur gélose à partir d'une colonie suspecte.

Plusieurs éventualités peuvent alors se présenter qui entraînent diverses possibilités de classification :

ASPECT des colonies		CULTURE	
Culture rapide en 3, 4 jours à 37°	rugueux	pigmentée	= Bacilles paratuberculeux
		non pigmentée	= Bacilles paratuberculeux
	lisse	pigmentée	= Bacilles paratuberculeux (1)
		non pigmentée	= Bacilles paratuberculeux ou aviaires
Culture tardive plus de 6 jours à 37°	rugueux	pigmentée	= Bacilles paratuberculeux (1)
		non pigmentée	= Bacilles paratuberculeux ou tuberculeux humain, bovin, murin.
	lisse	pigmentée	= Bacilles paratuberculeux (1)
		non pigmentée	= Bacilles paratuberculeux, aviaire
Culture nulle = Bacilles paratuberculeux, murin, bovin, humain, aviaire, après un mois et plus.			

De l'examen de ce tableau, il ressort que dans aucun cas on ne saurait écarter absolument l'éventualité d'un bacille paratuberculeux. On ne pourrait l'identifier à coup sûr que lors d'une culture, ou bien, rapide, rugueuse ou lisse et pigmentée, ou bien, tardive et pigmentée.

Il faut noter que la gélose ne permet pas d'apprécier pleinement le pouvoir chromogène, élément important pour l'identification d'une mycobactérie.

On voit que nous sommes loin du diptyque :

Culture positive sur gélose = bacilles paratuberculeux.

Culture négative sur gélose = bacilles tuberculeux.

Cette notion, déjà ébranlée par la connaissance de bacilles paratuberculeux ne se cultivant pas ou mal sur gélose, devient à

(1) Nous n'avons pas observé sur gélose de colonies de bacilles humain ou aviaire chromogènes.

peu près erronée par le fait généralement méconnu que les bacilles tuberculeux vrais peuvent donner une culture sur ce milieu.

En définitive, la possibilité de se développer sur les milieux usuels et notamment sur la gélose ordinaire, ne constitue qu'un élément de valeur relative dans l'ensemble des caractères propres aux bacilles paratuberculeux. L'indétermination et l'instabilité de ces caractères dans la pratique courante du laboratoire lors de l'isolement ont été clairement mis en relief par Coletsos [13].

CONCLUSIONS.

1° Si le développement à partir des produits pathologiques, traités du bacille tuberculeux humain ou bovin est extrêmement difficile sur la gélose ordinaire, la culture à partir de souches anciennement ou récemment isolées est assez facile.

2° Sur ce milieu, les souches bovines dysgoniques lisses se manifestent d'emblée sous la forme rugueuse ; ce caractère est réversible.

3° La culture en série des mycobactéries sur gélose nutritive n'entraîne pas nécessairement la diminution de la virulence, de la taille et de la colorabilité.

4° Les bacilles paratuberculeux s'y cultivent de diverses façons. Si certains se révèlent en trois à quatre jours, d'autres apparaissent après des délais aussi longs que ceux exigés par le bacille tuberculeux.

De ces faits il résulte que l'intérêt de la culture sur gélose pour différencier les bacilles tuberculeux des bacilles paratuberculeux se trouve singulièrement limité. En effet, en dehors de caractères cultureux ou pigmentaires très marqués, seul un développement en trois à quatre jours permet d'identifier un bacille paratuberculeux, encore le doute peut-il subsister en faveur du bacille tuberculeux aviaire si la souche est lisse et peu chromogène.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. BORREL. *Bull. Inst. Pasteur*, 1904, **2**, 409.
- [2] P. MOELLER. *Berl. tierärztl. Wschr.*, 1903, **9**, 141.
- [3] R. KOCH. *Mitt. kais. Gesundh.*, 1884, **2**, 66.
- [4] A. VAUDREMER. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, **84**, 259.
- [5] A. VAUDREMER. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, **94**, 120.
- [6] M. van RIEMSDIJK. *Zentralbl. Bakt.*, 1933, **128**, 504.
- [7] E. GRASSET. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **119**, 261.
- [8] A. IMMAMURA. *Med. J. Osaka Univ.*, 1952, **3**, 383.
- [9] J. R. CALMELS et H. BOISVERT. *Ces Annales*, 1952, **83**, 338.
- [10] I. STRAUS et GAMALEIA. *Arch. Méd. exp.*, 1891, **31**, 457.

- [11] P. HAUDUROY. *Inventaire et Description des Bacilles Paratuberculeux*. Masson édit., Paris, 1946.
- [12] R. SANSONNENS. *Thèse de Méd. Lausanne*. Peyronnet édit., Paris, 1946.
- [13] P. J. COLETSOS. *Ces Annales*, 1949, **76**, 191.
- [14] A. MEYN. *Zentralbl. Bakt.*, 1952, **158**, 298.
- [15] K. A. JENSEN. *Bull. Univ. int. Tuberc.*, 1954, **24**, 81.
- [16] G. PENSO in P. HAUDUROY. *Inventaire et Description des bacilles tuberculeux et paratuberculeux*. Masson édit., Paris, 1950.
- [17] H. C. ENGBAECK. *Acta path. et microb. scand.*, 1954, **34**, 68.

DÉVELOPPEMENT DU VIRUS GRIPPAL ET pH DU LIQUIDE ALLANTOÏQUE DE L'ŒUF EMBRYONNE.

III. — ACTION FAVORISANTE DU CARBONATE DE MAGNÉSIUM.

par B. FAUCONNIER (*)

*(Institut Pasteur. Centre National de la Grippe.
Service de M. R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE.)*

Nous avons montré récemment [1, 2] qu'au-dessous d'une certaine valeur de pH qui se situe au voisinage de pH 5,8-6, le liquide allantoïque de l'œuf embryonné normal ne permet plus le développement du virus grippal, lorsque celui-ci y est inoculé. La mise en évidence de ce phénomène entraînait la recherche d'un corps chimique alcalin susceptible de remonter le pH du liquide à une valeur compatible avec l'infection. Si, uniquement après injection de ce corps dans le liquide allantoïque préalablement inoculé de virus, l'infection pouvait survenir, il était apporté un argument de plus dans la démonstration du rôle essentiel du pH du liquide allantoïque au cours de l'un ou de plusieurs des phénomènes qui président à la fixation ou à la multiplication du virus grippal dans la membrane chorio-allantoïque et à sa libération dans le liquide allantoïque.

Le carbonate de magnésium, comme élément alcalinisant, a été choisi pour plusieurs raisons : il s'agit tout d'abord d'un corps peu toxique pour l'œuf à des doses actives. Au seizième jour d'incubation, l'embryon supporte des doses allant jusqu'à 40 mg par œuf. L'embryon de dix à onze jours est beaucoup plus sensible. D'autre part, le carbonate de magnésium, par sa propriété d'être peu soluble dans l'eau, permet non seulement de relever un pH allantoïque légèrement acide, mais encore de s'opposer efficacement à l'abaissement du pH qui se produit d'une part à la suite de la décharge d'acides (acide urique en particulier) et d'autre part à cause de l'utilisation de la réserve alcaline du liquide en vue de la constitution osseuse de l'embryon, phénomènes qui surviennent dans le liquide allantoïque de l'œuf

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 7 octobre 1954.

embryonné normal vers le treizième ou quinzième jour d'incubation [3, 4, 5, 6]. Le carbonate ajouté est ainsi utilisé au fur et à mesure des besoins et reste entre temps en réserve sous une forme peu utilisable directement par l'embryon. Il agit comme un tampon efficace du liquide allantoïque. D'autres substances, telles que le CO_3Ba , CO_3HNa et $(\text{PO}_4)_2\text{HNa}_2$ ont été utilisées et ont donné des résultats analogues à ceux enregistrés avec le CO_3Mg . Cependant, ils se révélèrent moins constants et moins actifs dans leurs effets, en particulier en ce qui concerne les deux derniers corps qui sont totalement solubles.

Le rôle de CO_3Mg sera donc étudiée sous les deux aspects suivants :

1° Action favorisante de CO_3Mg sur la réceptivité à l'infection virale par voie allantoïque d'une part d'œufs embryonnés vieillissants, et d'autre part d'œufs embryonnés de seize jours à pH allantoïque inférieur à 6.

2° Action préventive de CO_3Mg contre la perte du pouvoir réceptif d'œufs embryonnés vieillissants à l'infection virale par voie allantoïque.

MATÉRIEL ET MÉTHODE.

OŒufs embryonnés : œufs de Leghorn incubés à la température de 38°5.

Souche de virus grippal : une souche A-PR8 entretenue au laboratoire par passage sur œuf et dont le titre infectant 50 p. 100, pour des œufs de dix jours d'incubation, est de 10^{-8} . Le liquide allantoïque virulent est distribué dans une série de tubes à la dose de 0,5 ml. Les tubes sont placés à la température de — 28° et décongelés un à un au fur et à mesure des besoins.

Ponction et détermination du pH du liquide allantoïque de l'œuf embryonné : la technique complète a été décrite dans une note précédente [2].

Carbonate de magnésium : CO_3Mg pur, en suspension dans de l'eau bidistillée et stérilisée à 120° pendant vingt minutes. La suspension étant à 2 p. 100, 1 ml contient 20 mg de carbonate.

Test de présence du virus : hémagglutination avec hématies de poulet.

Les examens entrepris ici sur la multiplication du virus dans les œufs traités ou non par le carbonate de magnésium sont uniquement qualitatifs ; c'est-à-dire que l'on recherchera seulement à savoir si dans chaque liquide le virus s'est suffisamment développé pour produire une hémagglutination visible après quarante-huit heures de culture. En aucun cas le titre hémagglutinant du liquide, c'est-à-dire la quantité de virus qu'il contient, ne sera recherché.

I. — ACTION FAVORISANTE DE CO_3Mg SUR LA RÉCEPTIVITÉ
D'ŒUFS EMBRYONNÉS VIEILLISSANTS
A L'INFECTION VIRALE PAR VOIE ALLANTOÏQUE.

Dans une note précédente [2], nous avons montré qu'à partir du douzième ou treizième jour d'incubation, la capacité réceptrice d'œufs embryonnés à l'infection virale par voie allantoïque allait en diminuant parallèlement d'une part à la baisse moyenne du pH du liquide allantoïque, et d'autre part surtout à l'augmentation quotidienne du nombre des œufs à pH allantoïque inférieur à 6.

Il était donc intéressant de voir si l'adjonction d'un carbonate alcalin à l'inoculum virulent était capable d'augmenter le pourcentage quotidien des œufs réceptifs par rapport à celui d'œufs qui n'ont pas reçu d'alcalinisant.

EXPÉRIMENTATION. — Des œufs embryonnés de quatorze, quinze et seize jours sont inoculés par voie allantoïque avec la souche A-PR8 à la dilution de 10^{-5} . Aussitôt après, la moitié des œufs de chaque jour considéré reçoit par la même voie et par unité 20 mg de suspension de CO_3Mg à 2 p. 100. L'autre moitié, qui sert de témoin, reçoit, dans les mêmes conditions, 1 ml d'eau bidistillée. L'ensemble des œufs est mis à l'étuve à 35° C pendant quarante-huit heures, puis la présence du virus est recherchée par hémagglutination dans chaque liquide allantoïque, dont quelques gouttes ont été prélevées.

RÉSULTATS (fig. 1). — Pour les trois jours considérés, le pourcentage des liquides allantoïques infectés est beaucoup plus élevé dans les séries ayant reçu du carbonate que dans les séries témoins. La figure 1 montre que les courbes de réceptivité sont nettement décalées tout en accusant une allure descendante semblable. L'adjonction de carbonate permet ainsi de relever la réceptivité moyenne des œufs de quatorze jours de 66 p. 100 à 95 p. 100, de ceux de quinze jours de 43 p. 100 à 86 p. 100, et enfin de ceux de seize jours de 31 p. 100 à 70 p. 100.

II. — ACTION FAVORISANTE DU CARBONATE DE MAGNÉSIUM
SUR LA RÉCEPTIVITÉ A L'INFECTION VIRALE
PAR VOIE ALLANTOÏQUE D'ŒUFS EMBRYONNÉS DE SEIZE JOURS
A pH ALLANTOÏQUE INFÉRIEUR A 6.

Parmi les œufs qui, dans l'expérience précédente, ont reçu du carbonate, il en est un certain nombre qui n'a pas été infecté (30 p. 100 à seize jours). Ceci s'explique du fait qu'à cet âge beaucoup d'œufs ont un pH allantoïque trop acide pour

que la quantité de carbonate injecté (volontairement limitée à 20 mg par œuf à cause de sa toxicité possible pour des embryons de quatorze jours) puisse le relever à une valeur compatible avec l'infection (supérieure à 6). Nous allons voir maintenant que des doses doubles de carbonate sont supportées par des œufs de seize jours, et qu'elles diminuent considérablement le pourcentage des œufs non réceptifs, à cet âge de l'embryon. Considérons donc uniquement le cas d'œufs à pH

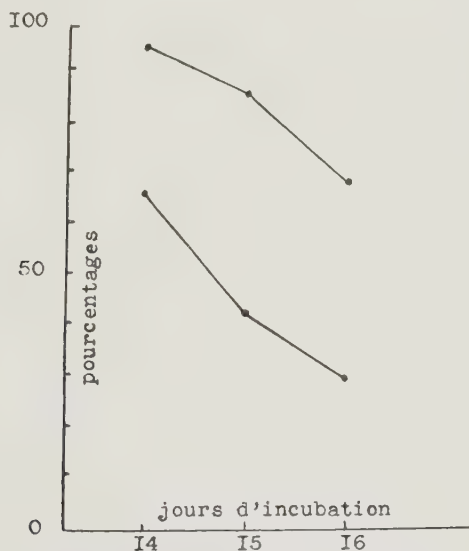


FIG. 1.

allantoïque inférieur à 6 (par conséquent réputés non réceptifs) et déterminons dans quelle mesure différentes doses de carbonate peuvent provoquer la réceptivité de ces œufs à l'inoculation de doses variables de virus par voie allantoïque.

EXPÉRIMENTATION. — Des œufs embryonnés de seize jours sont ponctionnés, et le pH du liquide allantoïque de chacun est déterminé. Seuls sont sélectionnés les œufs dont le pH allantoïque est inférieur à 6. Des lots de ces œufs sélectionnés sont inoculés par voie allantoïque avec des doses décroissantes de virus A-PR8 allant de 10^{-1} à 10^{-8} . Pour chaque dilution de virus, trois doses de CO_3Mg (40, 20 et 10 mg) sont injectées aussitôt après inoculation par la même voie. A chaque dilution de virus correspond une quatrième série comprenant des œufs inoculés de virus, mais ayant reçu ensuite, à la place de carbonate, 2 ml

d'eau bidistillée : série témoin. Les œufs sont ensuite replacés à l'étuve à 35° pendant quarante-huit heures, puis de nouveau ponctionnés afin de déterminer par hémagglutination ceux dans lesquels le virus s'est développé.

RÉSULTATS (fig. 2). — Les œufs témoins qui n'ont pas reçu de carbonate ne se sont pas révélés, à de rares exceptions près,

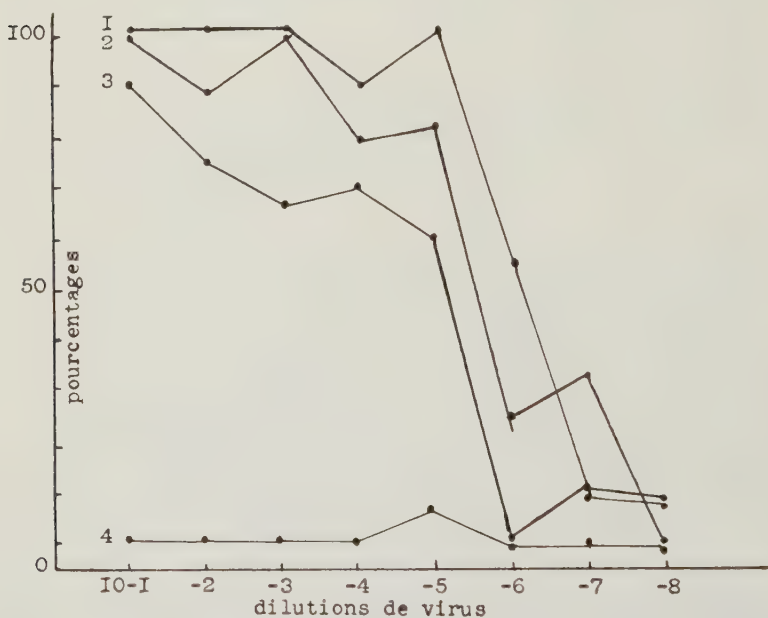


FIG. 2. — 1. CO₃Mg : 40 mg. 2. CO₃Mg : 20 mg. 3. CO₃Mg : 10 mg. 4. Témoins.

réceptifs à l'infection, même aux plus hautes concentrations de virus. Par contre, les œufs dont le liquide allantoïque a reçu du carbonate ont été infectés dans de très fortes proportions, et jusqu'à des dilutions de virus de 10⁻⁵. Le pourcentage d'infection est plus élevé parmi les œufs qui ont reçu une plus grande quantité de carbonate. La dose de 40 mg donne 100 p. 100 d'infection jusqu'à la dilution de virus de 10⁻⁵, mais cette dose s'est révélée limite et quelques œufs ont succombé à cette quantité. La dose de 20 mg est presque aussi efficace et absolument inoffensive pour des œufs de seize jours d'incubation. A la dilution de virus de 10⁻⁸ le pourcentage d'infection est à peu près nul quelle que soit la dose de carbonate. Cette dilution de virus correspond d'ailleurs à la limite du pouvoir infectant de la souche employée pour des œufs normaux de dix ou onze jours.

En résumé, l'emploi du carbonate ramène le pH d'un liquide allantoïque trop acide, et par suite incompatible avec l'infection, à une valeur suffisante (supérieure à 6) pour que cette infection puisse se faire. Si l'on note des différences suivant la dose de carbonate injecté pour une même quantité de virus, c'est que les œufs sélectionnés sont plus ou moins acides et nécessitent une plus ou moins grande quantité de tampon pour arriver à un pH compatible avec l'infection. Tel liquide à pH 5 exigera 40 mg de carbonate pour remonter à pH 6,5, alors qu'il suffira de 10 mg à un liquide à pH 5,8. La quantité de liquide de chaque œuf intervient également. Un fait important à noter, est que, parmi les œufs témoins, quelle que soit la dose de virus, l'infection est nulle. Au-dessous de pH 5,8, le virus, même en grande quantité, ne peut se développer dans le liquide.

III. — ACTION PRÉVENTIVE DE CO_3Mg CONTRE LA PERTE DU POUVOIR RÉCEPTIF D'ŒUFS EMBRYONNÉS À L'INFECTION VIRALE PAR VOIE ALLANTOÏQUE.

Jusqu'à présent, le carbonate de magnésium a toujours été injecté aussitôt après inoculation du virus. Considérons maintenant le cas où un lot d'œufs embryonnés relativement jeunes reçoit par unité une certaine quantité de carbonate, et examinons si cet apport permet d'enrayer ou de diminuer la perte moyenne de leur pouvoir réceptif à l'inoculation du virus pratiquée dans les jours qui suivent.

EXPÉRIMENTATION. — Des œufs embryonnés de treize jours reçoivent par voie allantoïque 20 mg de carbonate de magnésium par œuf. Un lot équivalent d'œufs du même âge reçoit par la même voie 1 ml d'eau bidistillée (lot témoin). L'ensemble est remis à la couveuse à 38°5 et un tiers des œufs de chacun des deux lots (lot traité et lot témoin) est inoculé avec la souche A-PR8 diluée à 10^{-6} après vingt-quatre heures, quarante-huit heures et soixante-douze heures, c'est-à-dire à des âges embryonnaires de quatorze, quinze et seize jours. Après inoculation du virus dans chaque lot, les œufs sont remis pendant quarante-huit heures à l'étuve à 35°, puis ponctionnés pour y rechercher la présence ou l'absence de virus.

RÉSULTATS (fig. 3). — On trouve respectivement dans les lots d'œufs inoculés à vingt-quatre, quarante-huit et soixante-douze heures, 56 p. 100, 50 p. 100 et 24 p. 100 de liquides hémagglutinants pour les lots témoins, et 96 p. 100, 95 p. 100 et 70 p. 100 de liquides hémagglutinants pour les lots traités préventivement au carbonate. La proportion des œufs où le virus s'est déve-

loppé est donc beaucoup plus considérable dans les œufs qui ont reçu du carbonate, et ceci soixante-douze heures même après injection de ce produit. Injecté préventivement, le CO_3Mg est capable par son action alcalinisante soutenue de pallier dans une grande mesure la perte de réceptivité normale du liquide allantoïque d'œufs vieillissants à l'infection virale.

RÉSUMÉ.

Le carbonate de magnésium, par ses propriétés alcalinisantes, est capable d'augmenter dans de grandes proportions la récep-

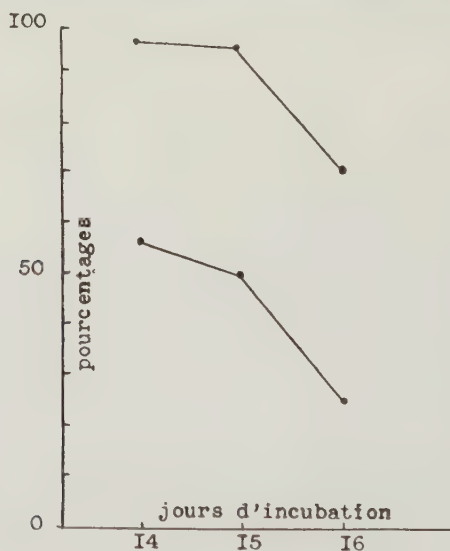


FIG. 3.

tivité d'œufs embryonnés vieillissants à l'infection grippale par voie allantoïque.

Injecté dans le liquide allantoïque au moment même de l'inoculation du virus, ce produit permet, à tout âge de l'embryon, d'accroître le pourcentage des œufs réceptifs en amenant à un pH compatible avec l'infection un certain nombre de liquides allantoïques qui, normalement, ne permettraient pas l'infection.

Injecté à des doses suffisantes dans des liquides allantoïques sélectionnés pour leur pH incompatible avec l'infection (pH inférieur à 6), il peut produire 100 p. 100 d'infection alors que les témoins restent indemnes, même pour des concentrations relativement élevées de virus.

Enfin injecté préventivement à des œufs relativement jeunes, il est capable de pallier dans une grande mesure, en s'opposant à la baisse normale du pH du liquide allantoïque, la perte de la réceptivité de ce liquide à l'infection virale.

D'autres substances alcalines (CO_3Ba , CO_3HNa , $(\text{PO}_4)_2\text{HNa}_2$) ont donné des résultats semblables.

Ces résultats confirment le rôle important que joue le pH du liquide allantoïque dans les phénomènes de multiplication du virus grippal dans l'œuf embryonné.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] B. FAUCONNIER. *Ces Annales*, 1953, **85**, 222.
- [2] B. FAUCONNIER. *Ces Annales*, 1954, **86**, 710.
- [3] T. ISEKI. *Z. physiol. Chem.*, 1930, **188**, 189.
- [4] J. SULA. *C. R. Soc. Biol.*, **120**, 911.
- [5] H. B. FELL et R. ROBISON. *Biochem. J.*, 1934, **28**, 2243.
- [6] P. A. WALKER. *J. gen. Physiol.*, 1943, **26**, 503.

L'ACTION DE LA PÉNICILLINE SUR LE MÉTABOLISME PROTIDIQUE DANS LES CELLULES PROLIFÉRANTES DES BACTÉRIES

(TROISIÈME PARTIE) *

par LLOYD G. K. CARR et M. MACHEBOEUF †.

(Institut Pasteur.)

Clostridium sporogenes, SOUCHE SENSIBLE, SOUCHE RÉSISTANTE.

I. ACTIVITÉ PEPTIDASIQUE. — Dans le but de rechercher si l'inhibition des activités peptidasiques avait une importance biologique générale dans le mécanisme de la toxicité relative de la pénicilline, nous avons envisagé le cas de souches résistantes à la pénicilline.

Par la méthode de la dilution en série, une souche résistante de *Clostridium sporogenes* a été produite, grâce à laquelle nous avons fait une comparaison d'activité dipeptidasique entre la souche résistante et la souche sensible. La résistance développée par *Clostridium sporogenes* était de l'ordre de quatre-vingts (80) unités Oxford de pénicilline par millimètre. La sensibilité de la souche normale dont elle dérivait était de l'ordre de dix unités Oxford de pénicilline par millilitre. Avec ces souches nous avons étudié l'hydrolyse de la *d-l-glycylglycine* par le dosage selon la technique de Foreman [1] des groupements carboxyles correspondant aux amino-acides libérés.

Pour nos études avec une souche résistante de *Clostridium sporogenes*, nos études sur la réaction de Stickland [3], nous avons un peu modifié les processus employés dans nos études peptidasiques comme nous l'exposons dans ce qui suit.

Pour la croissance de la souche résistante et sensible de *Clostridium sporogenes* le milieu peptone-levure-glucose fut employé dans les mêmes proportions que celles utilisées antérieurement pour nos études peptidasiques (1). On inocule cent (100) ml de

(*) Manuscrit reçu le 15 avril 1954.

(1) Notons que pour nos recherches sur la réaction de Stickland, le glucose est éliminé, car cette substance empêche la marche propre de cette réaction.

TABLEAU I. Comparaison entre la souche sensible et la souche résistante de « *Clostridium sporogenes* ».

SUBSTRATS		POURCENTAGE des groupes NH_4 libérés en fonction du temps. Témoins déduits				POURCENTAGE des groupes NH_4 libérés en fonction du temps rapportés au nombre de mg d'azote bactérien total			
		Temps des prélèvements en heures				Temps des prélèvements en heures			
		1	2	1	2	1	2	1	2
		Souche sensible		Souche résistante		Souche sensible		Souche résistante	
Dipeptidase	Glycylglycine M/10 Cysteine M/6 Fe++ M/30	% 3,5	% 73,5	% 29,75	% 45,5	0,119	1,64	0,965	1,08

Incubation 4 heures. Volume total 3,5 ml. Suspension 1 ml. Température 37°5 C. Tampon phosphate M/75, pH 7,8 (glycylglycine). 25 ml de culture pour chaque prélèvement.

Résultats des mesures par l'appareil de Kjeldahl et l'électrophotomètre de Meunier. Souche sensible, souche résistante de « *Clostridium sporogenes* ».

	LECTURES PHOTOMÉTRIQUES mettant en évidence la croissance de bactéries		NOMBRE DE mg d'azote bactérien par l'appareil de Kjeldahl	
	Temps des prélèvements en heures		Temps des prélèvements en heures	
	1	2	1	2
Souche sensible . .	480	684	0,294	0,448
Souche résistante .	462	676	0,308	0,42

culture sensible et résistante ayant vingt (20) heures de croissance dans des flacons contenant cent cinquante (150) ml de milieu nouveau et sous vide. Après une et deux heures d'incubation, vingt-cinq (25) ml de culture sont prélevés. Ces prélèvements sont centrifugés à basse température et repris par 5 ml d'eau bidistillée. 0,5 ml de cette suspension est utilisé pour la détermination de

l'azote par la méthode de Kjeldahl. Nous avons ensuite vérifié la croissance à chaque prélèvement par des lectures à l'électrophotomètre de Meunier. Les mélanges ajustés à pH 7,8 contiennent les mêmes constituants et dans les mêmes proportions que ceux utilisés pour nos études peptidasiques. Notons que nous avons toujours opéré pour le *Clostridium* en tubes scellés sous vide. Après incubation et agitation des mélanges pendant quatre heures à 37°5 C, nous avons étudié l'hydrolyse de la *d*-*l*-glycyl-glycine par le dosage suivant la technique de Foreman. Nos résultats sont représentés dans les tableaux ci-dessus.

On voit que les activités peptidasiques dans la souche résistante sont très réduites. Ce fait établit un mécanisme de la toxicité relative de la pénicilline, car l'inhibition des activités peptidasiques a une importance biologique générale.

II. ACTIVITÉ OXYDORÉDUCTRICE VIS-A-VIS DES AMINO ACIDES. —

Pour déterminer s'il existe un processus de remplacement par lequel les bactéries résistantes de *Clostridium sporogenes* peuvent subvenir à leurs besoins énergétiques quand l'activité peptidasique est bloquée, nous avons étudié l'activité oxydoréductrice vis-à-vis des amino-acides par la réaction dite de Stickland qui s'applique particulièrement bien dans le cas des *Clostridia*.

Dans nos études sur la réaction de Stickland [3] nous avons inoculé dix (10) ml de culture de *Clostridium sporogenes* dans chacun des deux flacons, contenant deux cent cinquante (250) ml de milieu (de même composition que celui utilisé pour nos autres expériences, mais sans glucose); un flacon est utilisé pour la souche résistante, l'autre pour la souche sensible. Les cultures sont centrifugées à basse température après vingt heures (20) de croissance et les bactéries obtenues sont ensuite émulsionnées dans 5 ml de tampon borate 0,04 M. pH 7,2. Comme d'habitude les déterminations de l'azote sur 0,5 ml de la suspension sont effectuées par la méthode de Kjeldahl. Nous avons utilisé le couple alanine et *d*-*l*-glycine pour nos études de la réaction de Stickland. Nous effectuons le dosage de l'ammoniaque dégagé suivant la méthode de Raynaud et Gros [2]. Pour la réaction de Stickland nous avons préparé les mélanges de la façon suivante :

Suspension	4 ml
Alanine M/10	4 ml
Glycine M/5.	4 ml
Tampon borate 0,04 M pH 7,2.	Q. S. P. 5 ml

Les témoins sont les suspensions seules, les suspensions + l'alanine M/10, les suspensions + la glycine M/5, ajustées à 5 ml par du tampon borate.

Les résultats de nos expériences représentatives avec la réaction de Stickland sont donnés dans le tableau II.

TABLEAU II. — Réaction de Stickland.
Les mélanges sont effectués dans des tubes scellés sous vide.

A. Résultats obtenus	:	:	:	:	:
B. Différence entre les	:	Souche	:	Souche	:
résultats obtenus avec	:	sensible.	:	résistante	:
les suspensions seules	:		:		:
et celles en présence	:		:		:
d'acides-amino.	:		:		:
	:	A.	B.	A.	B.
SUSPENSIONS SEULES	:	4,125	—	5,5	
SUSPENSION + ALANINE M/10	:	4,125	0	5,5	
SUSPENSION GLYCINE M/5	:	4,325	0,2	5,7	0,2
SUSPENSION ALANINE M/10	:	11,375	7,45	12,05	6,75
GLYCINE M/5	:				
Suspension.					1 ml
Acides aminés					1 ml
Tampon borate 0,04 M pH 7,2 quantité suffisante pour faire					
le volume total.					5 ml
Incubation 4 heures à 37°5 C. en agitant. Résultats en ml d'ammoniaque N/100.					

Nous pouvons constater que l'activité oxydoréductrice vis-à-vis des amino-acides est conservée intacte par la souche résistante de *Clostridium sporogenes*.

CONCLUSION.

Le passage de la sensibilité à la résistance pour *Clostridium sporogenes* s'accompagne d'une diminution marquée des activités peptidasiques. Ceci montre l'importance de l'inhibition causée par la pénicilline sur le métabolisme des peptides pour expliquer l'antibiose de *Clostridium sporogenes*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. FOREMAN. *Biochem. J.*, 1920, **14**, 451.
- [2] M. RAYNAUD et F. GROS. *Ces Annales*, 1947, **73**, 1003.
- [3] L. H. STICKLAND. *Biochem. J.*, 1934, **28**, 1746.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 4 Novembre 1954

Présidence de M. PRÉVOT.

COMMUNICATIONS

APPARITION DE L'IMMUNITÉ CONTRE « *PLASMODIUM BERGHEI* » CHEZ LES SOURIS SOUMISES AU RÉGIME LACTÉ OU A LA SULFAMIDOTHÉRAPIE

par G. FABIANI et M^{lle} J. ORFILA.

(*Laboratoire de Bactériologie, Faculté de Médecine, Alger.*)

Il est bien établi que le paludisme expérimental à *Plasmodium berghei* provoque chez la souris blanche une infection toujours mortelle ; seule fait exception une souris étudiée par Vincke [1]. Malgré la durée parfois longue de la maladie, aucune manifestation de résistance spécifique n'apparaît [2]. Un problème d'ordre général est ainsi posé : comment se fait-il que la souris, capable de s'immuniser contre d'autres microbes, n'acquière pas d'immunité contre cet hématozoaire, qui, chez d'autres espèces animales, se révèle doué de propriétés anti-géniques ?

Mais le régime lacté, dont l'action antipaludéenne a été découverte par Maegraith, ou la chimiothérapie, ajoutant leurs effets à ceux de la résistance naturelle de l'organisme, permettent d'obtenir la guérison de souris impaludées. Il était donc logique de rechercher si cette disparition de l'infection n'était pas due, au moins pour une part, à l'intervention de l'immunité spécifique. Et, en mars 1954, nous rapportons le cas de deux souris qui, grâce à la diète lactée, étaient non seulement guéries mais immunisées [3], puis nous en citons d'autres dans des communications sur l'action du régime lacté [4] et de la sulfamidothérapie [5]. De nouvelles observations nous incitent à rapporter le résultat de ces recherches portant sur 94 animaux impaludés soumis à l'une ou l'autre de ces conditions expérimentales.

Nous n'indiquerons ici ni les techniques d'étude de cette maladie que nous avons déjà exposées [2], ni le détail des observations qui sera rapporté plus tard.

I. ACTION DU RÉGIME LACTÉ. — Treize souris, sur 51 mises au régime lacté strict sans addition de vitamines, ont guéri du paludisme après avoir présenté une parasitémie faible, brève, se terminant par une crise, et n'ont pas eu ensuite de rechutes spontanées. Parmi elles, 7 ont subi une nouvelle inoculation qui ne provoqua aucune infection mortelle. Mais la diète lactée pouvant s'opposer au développement de l'hématozoaire, on ne pouvait affirmer l'immunité que si les animaux subissaient l'épreuve du régime normal ou de la réinoculation.

a) *Epreuve du régime normal.* — Douze souris dont la parasitémie avait disparu ont alors reçu une alimentation normale. Cinq présentèrent une rechute mortelle. Trois autres eurent une brève infection sanguine qui guérit spontanément : elles étaient donc immunisées. Enfin, chez quatre, aucun parasite ne fut décelé dans le sang.

b) *Epreuve de la réinoculation.* — Un des animaux ayant guéri de cette rechute et trois qui n'en avaient pas présenté ont été réinoculés avec des quantités importantes d'hématozoaires. Une infection sanguine se développa chez trois souris, mais guérit. Aucune parasitémie n'apparut chez l'autre. Nous pouvons en conclure que toutes ces souris étaient immunisées.

c) Il nous a paru utile de recourir aussi à la *splénectomie*. Deux souris guéries et réinoculées subirent l'ablation de la rate, pendant que l'une (n° 274) était au régime lacté, après arrêt de cette diète chez l'autre (n° 500) ; cette dernière avait guéri d'une brève parasitémie après retour au régime normal et avait été réinoculée ensuite ; elle figure donc dans la statistique précédente. Il n'y eut pas de rechute après ablation de la rate, même quand la première fut, six jours plus tard, remise à l'alimentation normale. Cela indiquait uniquement l'absence d'infection latente. Elles ont été de nouveau inoculées ; la souris 274 eut une infection modérée puis très faible et chronique pendant un mois, jusqu'à la mort par anémie ; la souris 500 présenta une parasitémie importante qui disparut en quelques jours. Ces faits prouvent l'immunité, puisque ces souris se sont comportées comme des rats immuns et splénectomisés. Ils montrent aussi et le rôle de la rate (importance de la rechute, apparition d'une infection chronique) et l'intervention de facteurs extra-spléniques (disparition ou diminution de la parasitémie) dans l'immunité.

Donc, chez 7 souris, l'immunité acquise fut démontrée.

II. ACTION DE LA SULFAMIDOTHÉRAPIE. — Le traitement par la méthylglucamine de la sulfadiazine, appliqué pendant cinq jours à 28 souris, provoqua la disparition de la parasitémie chez neuf. Parmi celles-ci, trois eurent une rechute qui guérit spontanément. Ces trois souris et trois autres ont été réinoculées et présentèrent tout au plus une brève parasitémie. Ces six souris doivent donc être considérées comme immunisées. Une d'entre elles fut splénectomisée après cette réimpaludation : la réapparition d'hématozoaires dans le sang prouva qu'il existait une infection latente.

III. ASSOCIATION DU RÉGIME LACTÉ ET DE LA SULFAMIDOTHÉRAPIE. — Quinze souris ont subi une cure sulfamidée pendant qu'elles étaient à la diète lactée. Trois seulement ont survécu et furent mises au régime normal dix jours après la fin du traitement. Deux d'entre elles

n'avaient plus d'hématozoaires dans le sang et n'ont pas eu de rechutes, mais, réinoculées, ont présenté une infection manifeste ; l'une est morte, l'autre a guéri. Chez la troisième, la parasitémie persistait encore quand elle a été remise au régime normal qui, fait remarquable, provoqua en quelques jours la disparition de l'infection sanguine ; une réinoculation ne provoqua aucune « sortie » d'hématozoaires, mais ensuite l'ablation de la rate détermina une infection chronique. Donc deux souris avaient acquis une immunité spécifique.

IV. ETUDE HUMORALE DES SOURIS IMMUNISÉES. — Le test de séro-protection [6] a montré la présence d'un pouvoir protecteur dans le sérum de quatre souris immunisées. Il faut aussi citer les résultats de l'électrophorèse : le sérum des animaux immuns contenait une proportion plus importante de γ -globulines que le sérum de souris normales ou atteintes de paludisme mortel. Rapprochons-en le fait que la rate de ces souris contenait alors de nombreux *plasmocytes*, et l'on sait le rôle vraisemblable de ces cellules dans la production des anticorps.

DISCUSSION. — L'existence de l'immunité spécifique a été démontrée chez 15 souris par la résistance aux réinoculations, le réveil d'une infection latente après splénectomie ou la disparition d'une infection patente sans intervention thérapeutique. J. Lapierre a également constaté l'immunisation de souris après traitement par la nivaquine : la longue latence entre les rechutes chez cinq souris et surtout la guérison spontanée d'une de ces rechutes prouvent l'immunité [7]. De même, G. Raffaele a observé une souris qui, présentant une infection faible quand elle était à la diète lactée, a guéri quand elle fut mise à l'alimentation normale [8].

Le mécanisme de cette immunité antimalarique de la souris est comparable à celui qui a été décrit chez d'autres espèces animales : rôle important de la rate, qui maintient parfois l'infection sous une forme latente, suppléance possible mais incomplète de cet organe, d'où la maladie chronique des splénectomisés, apparition d'anticorps (pouvoir protecteur) dans le sang. Quant aux conditions qui permettent l'acquisition de cette immunité spécifique, elles sont encore mystérieuses. Ce n'est pas une plus longue durée de la maladie qui intervient car dans deux cas nous avons pu constater l'immunité deux semaines après l'inoculation. Il est possible que ce soit la faible intensité de l'infection qui permette l'immunisation, ou que les modifications de l'organisme de la souris par le régime lacté ou par les sulfamides la rendent apte à s'immuniser.

CONCLUSION. — 94 souris impaludées ont été soumises à la diète lactée ou à la sulfamidothérapie ; chez 15 d'entre elles, l'immunité spécifique contre *Plasmodium berghei* est apparue et a été démontrée par la résistance aux réinoculations, le réveil d'une infection latente provoqué par la splénectomie ou la disparition d'une infection patente sans intervention thérapeutique. Le mécanisme de cette immunité antimalarique est comparable à celui qui a été décrit chez d'autres espèces animales : rôle de la rate, apparition d'anticorps dans le sang. L'électrophorèse révèle l'augmentation des globulines γ dans le sérum des souris immunisées.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] I. VINCKE, E. PEETERS et G. FRANKIE. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 1953, 33, 269.
- [2] G. FABIANI et J. ORFILA. *Ces Annales*, 1954, 87, 38.
- [3] G. FABIANI. *Bull. Assoc. Microbiol. Fac. Pharmacie Nancy*, 1954, n° 56, 3.
- [4] G. FABIANI et J. ORFILA. *C. R. Soc. Biol.*, 1954, 148, 1239.
- [5] G. FABIANI et J. ORFILA. *C. R. Soc. Biol.*, 1954, 148, 1390.
- [6] G. FABIANI et G. FULCHIRON. *C. R. Soc. Biol.*, 1953, 147, 99.
- [7] J. LAPIERRE. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1954, 47, 380.
- [8] G. RAFFAELE et P. CARRESCIA. *Riv. Malariol.*, 1954, 33, 47.

RÉCIDIVE, APRÈS QUATRE ANS ET DEMI, D'UNE CONJONCTIVITE HUMAINE A VIRUS DE NEWCASTLE

par J. JACOTOT, A. VALLÉE et A. LE PRIOL.

(*Institut Pasteur. Service de Microbiologie Animale.*)

Nous avons rapporté, il y a quelques années, un exemple de contamination humaine par le virus de Newcastle ; il s'agissait, comme dans la plupart des cas de ce genre, d'une conjonctivite contractée par l'un de nous au laboratoire [1]. Les accidents, bénins et de courte durée, n'avaient laissé aucune trace ; mais le sérum du malade n'en avait pas moins acquis un certain pouvoir d'inhibition vis-à-vis du virus en cause.

Or, la même personne a contracté de nouveau, quatre ans et huit mois plus tard, dans des circonstances analogues, une infection du même type.

Observation clinique sommaire. — Le 11 juin 1954, au cours de manipulations, l'un de nous reçoit sur l'œil une goutte d'une suspension embryonnaire riche en virus de Newcastle. Le 13, à midi, les premiers troubles apparaissent et ils s'intensifient jusqu'au soir ; les manifestations objectives sont celles d'une conjonctivite aiguë, comme il y a quatre ans ; il n'y a ni céphalée, ni troubles de la vision, mais le malade accuse de la « lourdeur de la tête » et une sensation de « poids derrière l'œil » ; surtout, et c'est un fait nouveau, il souffre d'angine. La nuit est agitée, avec insomnie et probablement petite fièvre.

Les troubles d'origine oculaire restent stationnaires pendant deux jours, tandis qu'au niveau de la gorge la douleur et la gêne vont croissant.

Le 16, une amélioration générale se dessine ; le 17 au soir, tout est rentré dans l'ordre. Au cours de ce processus inflammatoire, il n'y a jamais eu exsudation conjonctivale, mais des mucosités fluides tapissaient la cavité gutturale.

Isolement et identification du virus. — Trois jours après la conta-

mination accidentelle, on passe sur le globe oculaire un écouvillon stérile imbibé d'eau physiologique ; des larmes se forment, qui sont absorbées par le coton ; on exprime dans un peu d'eau additionnée de pénicilline et de streptomycine.

a) Une heure après le prélèvement, on inocule sept œufs de poule au neuvième jour de l'incubation, chacun d'eux recevant dans la cavité allantoïdienne $0,1 \text{ cm}^3$ de l'eau de lavage de la conjonctive ; trois embryons resteront indemnes, les quatre autres meurent entre le deuxième et le septième jours ; ils sont légèrement congestionnés et leurs liquides donnent une réaction de Hirst positive.

L'un de ces liquides embryonnaires est employé à inoculer cinq œufs au dixième jour d'incubation, chacun en recevant par la même voie $0,1 \text{ cm}^3$ au 1/10. Tous les embryons meurent, deux ou trois jours après, et leurs liquides donnent tous une réaction de Hirst positive.

b) L'eau de lavage de la conjonctive est inoculée, à la dose de $0,5 \text{ cm}^3$ dans les muscles d'un coq neuf ; il contracte une peste mortelle en quatre jours ; on relève des lésions ulcéro-hémorragiques caractéristiques sur les muqueuses du proventricule et du cloaque.

L'un des liquides embryonnaires du deuxième passage sur œuf incubé est inoculé, à la dose de 1 cm^3 au 1/10, à deux coqs guéris de maladie de Newcastle qui resteront indifférents, et à deux coqs neufs qui meurent de peste cinq jours après.

Ainsi établie, la détermination du type de virus est confirmée par la réaction d'inhibition de l'agglutination : le même liquide embryonnaire perd son pouvoir hémagglutinant lorsqu'on le met en présence d'un sérum anti-Newcastle (le sérum employé l'inhibait jusqu'à la dilution 1/1280), mais il le conserve entièrement lorsqu'on le met en présence d'un sérum anti-peste aviaire du type historique.

Recherche des anticorps spécifiques dans le sérum du malade. — Contrairement à ce qui s'était produit après la première contamination, il n'a pas été possible de mettre en évidence la moindre trace d'anticorps dans le sérum du malade recueilli dans les semaines qui ont suivi l'inoculation accidentelle. Des prises de sang ont été faites les 14 juin, 6 et 20 juillet, c'est-à-dire trois, vingt-cinq et trente-neuf jours après le début de l'infection ; les réactions de déviation du complément et d'inhibition de l'hémagglutination pratiquées avec les trois échantillons de sérum sont restées négatives, et négative aussi l'épreuve de neutralisation du virus sur œuf embryonné avec l'échantillon du 6 juillet.

En résumé, un travailleur de laboratoire qui avait contracté, une fois déjà, une conjonctivite à virus de Newcastle s'est contaminé une deuxième fois, quatre ans et demi après. Cette deuxième infection s'est traduite, comme la première, par une inflammation aiguë de la conjonctive accompagnée de troubles généraux légers ; mais il s'y est joint un épisode pharyngé. Apparemment, la réceptivité du sujet était entière. D'autre part, à la suite de cette deuxième atteinte par le virus de Newcastle, et contrairement à ce qui avait été observé la première fois, le sérum du malade s'est révélé dépourvu d'anticorps spécifiques (tests de déviation du complément, d'inhibition de l'hémagglutination et de neutralisation du virus totalement négatifs). Encore qu'inat-

tendue, cette passivité de l'organisme humain est à rapprocher du comportement des animaux hyperimmunisés dont le sérum perd brusquement ou progressivement son aptitude à élaborer des anticorps.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] H. JACOTOT, A. VALLÉE et A. LE PRIOL. *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1950, 134, 106.

**IMMUNISATION DU COBAYE PAR VOIE NASALE
CONTRE LE VIRUS DES OREILLONS
ET ESSAI DE MISE AU POINT
D'UNE MÉTHODE DE DIAGNOSTIC RAPIDE
DE L'INFECTION OURLIENNE CHEZ L'HOMME**

par R. SOHIER, F. CHALLUT et Y. CHARDONNET (*).

(Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Lyon.)

Ayant obtenu de bons résultats au cours de la préparation de sérums de référence fixant le complément en présence d'antigènes destinés au diagnostic de la grippe, en immunisant les cobayes par voie nasale selon la méthode indiquée par Fulton [1], nous nous sommes proposé d'opérer de même façon avec le virus des oreillons (1). On sait, en effet, que cet animal produit des anticorps fixant le complément lorsqu'on lui injecte dans le péritoine ou sous la peau des suspensions de virus ourlien vivant ou inactivé (Cabasso et coll. [2], Sohier et coll. [3]) ou qu'on inocule du virus dans la chambre antérieure de l'œil (Bolin et coll. [4, 5]).

Nous avons pour but non seulement d'étudier les modalités du développement des sensibilisatrices intervenant dans la réaction de fixation du complément, mais aussi de mettre au point une méthode permettant d'obtenir chez l'homme plus rapidement que par celles employées à ce jour des données utilisables pour le diagnostic de l'infection ourlienne.

Dans cette note préliminaire, nous nous limiterons à l'exposé succinct des résultats que nous avons obtenus, d'une part lors de nos essais d'immunisation à partir de liquide allantoïque infecté et de salive humaine d'oreillard, d'autre part au cours de nos tentatives de

(*) Travail effectué grâce à une allocation de la Caisse Nationale de Sécurité Sociale, Institut National d'Hygiène (Directeur : professeur BUCNARD.)

(1) Au cours de la correction de ces épreuves, nous avons eu connaissance du travail de N. M. Burr et F. P. Nager (*Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1953, 83, 714) relatif à l'immunisation du hamster par voie nasale.

détection du virus dans un produit en mettant à profit l'injection dite de rappel pouvant faire intervenir rapidement la réactivité spécifique acquise lors de la première immunisation.

MATÉRIEL. — *A. Produits contenant le virus ourlien.* — 1° Liquide allantoïque d'œufs embryonnés inoculés au septième jour par voie allantoïque avec la souche BOS (vingtième passage), isolée dans notre laboratoire avec Esser [6], récolté au onzième jour, contrôle du pouvoir hémagglutinant sur hématies de poulet, utilisation immédiate ou après conservation à -20° .

2° Salive infectée : salive du malade Pac... prélevée au deuxième jour d'une parotidite ourlienne typique avec le sialo-préleveur (voir [3]). La présence du virus dans cette salive a été prouvée par inoculation dans la cavité amniotique d'œuf embryonné et obtention d'un liquide hémagglutinant spécifiquement les hématies de poulet.

B. Sérums. — Sérums de référence : obtenus chez l'homme au décours des oreillons et chez le cobaye par injection intrapéritonéale.

Sérums à expertiser obtenus chez le cobaye par saignée à la veine des pattes antérieures selon un procédé simple consistant en un sectionnement de la veine perpendiculairement à son grand axe, une pression étant exercée en aval entre le pouce et l'index : on peut recueillir ainsi 2 ml de sang et répéter ce prélèvement tous les six à sept jours.

C. Antigènes. — Liquides allantoïques et amniotiques mélangés d'œufs inoculés avec la souche BOS. Ne sont retenus comme antigènes que les liquides fixant le complément à la dilution de 1/2 ou mieux de 1/4 en présence de sérum de référence. Dans la réaction, on emploie deux unités antigéniques.

D. Animaux. — Cobayes de différents élevages d'un poids de 300 à 400 g.

MÉTHODE. — *Inoculation du cobaye.* — Inhalation d'éther de façon à obtenir une anesthésie aussi complète que possible. Dépôt, goutte à goutte, sur un seul orifice narinaire, du liquide à inoculer. Le liquide doit être aspiré complètement. Il arrive qu'il y ait un léger reflux avec production de bulles ; on continue cependant l'instillation après avoir, si nécessaire, redonné une anesthésie.

Réaction de fixation du complément. — Technique précédemment décrite (voir Sohler et Esser [7], voir aussi [3]) mais modifiée quant aux volumes pour réaliser, non plus une semi-micro-méthode, mais une micro-méthode.

RÉSULTATS OBTENUS. — 1° *Immunisation par voie nasale avec des liquides d'œuf embryonné infecté.* — a) Avec les liquides récemment recueillis, 10 animaux ont été inoculés avec des concentrations variables en virus appréciées par le pouvoir hémagglutinant :

Liquides frais hémagglutinant : à 1/640, cob. 161, 162, 173 ; à 1/320, cob. 160, 167, 168, 169 ; à 1/40, cob. 165, 172 ; à 1/10, cob. 171.

b) Avec les liquides conservés à -20° pendant vingt et un jours : 6 animaux ont été inoculés ; pour le liquide hémagglutinant : à 1/640, cob. 197 ; à 1/320, cob. 187, 191 ; à 1/320, après dilution au 1/10, cob. 188, 190, 198. Les résultats sont donnés dans la figure 1. Il en ressort essentiellement que tous les animaux produisent des anticorps, au plus tôt entre le quatrième et le sixième jour, et qu'un taux élevé est atteint entre le douzième et le quatorzième jour.

Nous nous sommes assurés que le liquide allantoïque normal inoculé dans les mêmes conditions ne produisait aucune modification humorale décelable par fixation du complément (cob. 199, 200, 201).

2° *Immunisation par voie nasale avec la salive de sujet atteint de parotidite ourlienne.* — Trois animaux (cob. 183, 193, 195) ont reçu respectivement (en raison de la petite quantité de salive dont nous

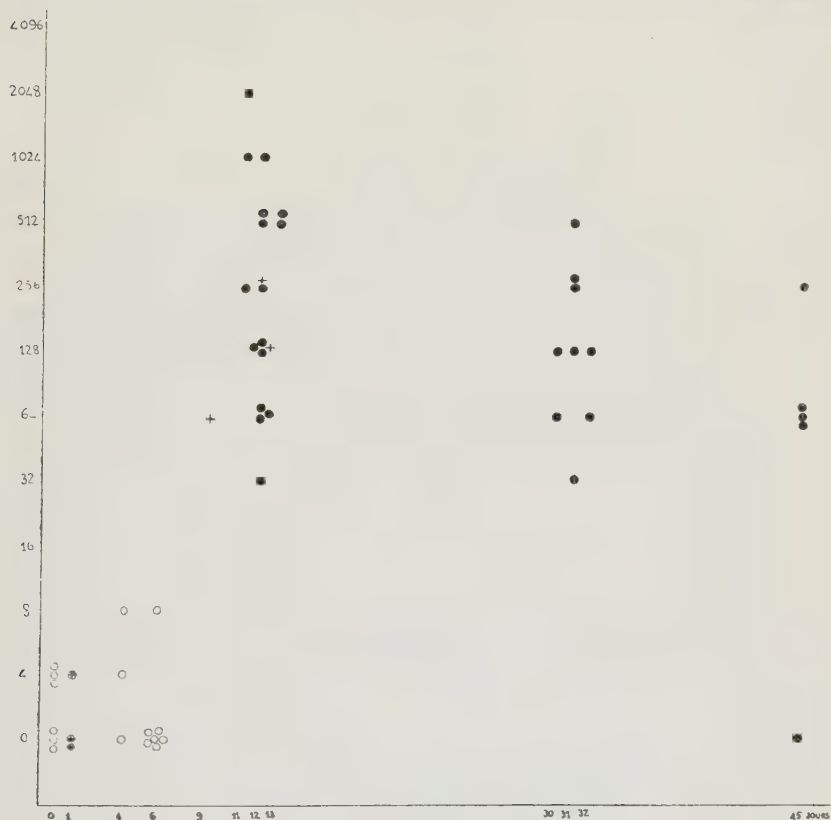


FIG. 1.

- FIG. 1.
- Première prise de sang des cobayes inoculés avec du liquide allantoïque infecté (BOS.)
 - ⊕ Première prise de sang des cobayes inoculés avec la salive d'oreillons.
 - Prises de sang effectuées à partir du 11^e jour pour les cobayes inoculés avec le liquide allantoïque infecté.
 - ⊕ Prises de sang effectuées à partir du 11^e jour pour les cobayes inoculés avec la salive d'oreillons.

dispositions) 0,5, 1 et 0,4 ml par voie nasale de salive du malade Pac... (voir plus haut). Ils ont tous élaboré des anticorps fixant le complément en présence d'antigène ourlien et à des taux assez élevés (voir fig. 1).

Un contrôle a été réalisé par inoculation à trois animaux (cob. 202,

203, 204) de salive parotidienne normale : aucune modification sérologique décelable par réaction de fixation du complément n'a été constatée.

3° *Recherche de l'action d'une inoculation de « rappel » chez des cobayes préalablement immunisés.* — Nous nous proposons d'obtenir chez des cobayes dont le titre d'anticorps avait baissé, une réascension de ce titre sous l'action d'une nouvelle inoculation en mettant à profit cette réactivité spécifique acquise dont les effets sont souvent rapides, pour déceler la présence du virus ourlien dans un produit.

a) Nous avons constaté que le titre des anticorps diminuait lentement et que s'il commençait à baisser au trentième jour, comme l'indique le prélèvement effectué dans ce délai, au quarante-cinquième jour il demeurerait encore assez élevé. Mais nous avons pu observer chez le cobaye 137, dont le titre des anticorps sériques était nettement abaissé au 70^e jour (1/16), que l'inoculation intranasale de liquide de culture provoquait l'élaboration d'un taux élevé d'anticorps (1/128) dès le sixième jour. Les recherches sont actuellement poursuivies afin d'apprécier si le phénomène est constant et suffisamment net chez tous les animaux, compte tenu des facteurs individuels que l'on ne saurait négliger.

b) L'intérêt pratique de la méthode ne peut être réellement prouvé que si l'on obtient le même résultat avec un produit pathologique contenant le virus (salive ou liquide céphalo-rachidien, etc.) recueilli chez l'homme.

C'est dans ce but que nous avons réinoculé deux cobayes (cob. 160, 165) avec de la salive du malade Pac... conservée vingt-huit jours à — 20°.

Nous avons constaté que six jours après cette réinoculation, le cobaye 160 avait élaboré des anticorps de telle sorte (64/32 avant et 256/64 après inoculation de rappel) qu'on puisse considérer cette modification sérologique comme consécutive à l'inoculation du produit contenant le virus ourlien. On doit remarquer qu'il s'agissait d'une salive conservée vingt-huit jours à — 20° et dont la teneur en virus était probablement plus faible que celle de la salive fraîche.

Certes, il ne s'agit là que d'essais préliminaires et il conviendra de rechercher si le phénomène s'observe avec une régularité et une netteté suffisantes pour qu'il puisse être utilisé à des fins diagnostiques.

Des études du même ordre sont poursuivies par le même procédé en ce qui concerne la grippe ; les résultats en seront donnés ultérieurement.

RÉSUMÉ. — On peut obtenir chez le cobaye inoculé par voie intranasale, sous anesthésie à l'éther, avec du liquide allantoïque d'œuf infecté par le virus ourlien, des sérums contenant des anticorps fixant le complément à un titre élevé. Les mêmes résultats sont obtenus avec l'inoculation de salive parotidienne du malade atteint d'oreillons et dans laquelle le virus est présent.

La réinoculation par la même voie de liquide allantoïque infecté produit une réascension assez rapide des anticorps chez un animal dont le titre des anticorps sériques avait baissé suffisamment. Le même résultat, bien que moins net en raison probablement de la plus

faible teneur en virus du produit utilisé, est obtenu avec la salive de malade. On peut espérer trouver dans ce phénomène une méthode pratique de diagnostic rapide de l'infection ourlienne, sous réserve que les études actuellement poursuivies confirment ces premières constatations.

BIBLIOGRAPHIE

- [4] A. FULTON et A. ISAACS. *J. gen. Microbiol.*, 1953, **9**, 119.
- [2] V. CABASSO, J. M. RUESSEGER, G. K. LOOSER et H. R. COX. *J. Lab. clin. Med.*, 1950, **35**, 771.
- [3] R. SOHIER, in P. LÉPINE et R. SOHIER. *Méthodes de laboratoire appliquées au diagnostic des maladies à virus*. Masson édit., Paris, 1954.
- [4] V. S. BOLIN et G. R. LEYMASTER. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1950, **75**, 166.
- [5] V. S. BOLIN et G. R. LEYMASTER. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1952, **79**, 7.
- [6] I. ESSER. Thèse Lyon, 1952. *Diagnostic de l'infection ourlienne par les méthodes biologiques spécifiques*. Imprimerie des Beaux-Arts, Lyon.
- [7] R. SOHIER, I. ESSER et J. JUILLARD. *Ces Annales*, 1952, **82**, 168.

TECHNIQUE SIMPLE D'OBSERVATION MICROSCOPIQUE DIRECTE DE LA CROISSANCE DE CELLULES BACTÉRIENNES SUR GÉLOSE

par R. DEVIGNAT

Médecin-Directeur de Laboratoire (Elisabethville, Congo belge).

Note présentée par M. G. GIRARD.

Nous avons recherché sans succès, dans la littérature à notre disposition, la description d'un procédé microscopique permettant l'observation directe de la division et de la multiplication microbiennes sur gélose. *A priori*, une observation aussi simple doit avoir été tentée, sinon réussie, et l'absence de référence permet de croire qu'il existe des difficultés techniques.

Et, en effet, notre première tentative fut un échec total : en voici la technique. Nous coulons 20 cm³ de milieu gélosé de Garber [1] dans une boîte de Petri stérilisée. Après prise, nous séchons à l'étuve à 30° C pendant vingt minutes, le couvercle étant soulevé. Ensuite, nous inondons la surface de cette gélose sèche de 1 à 2 cm³ d'une dilution à 1/10 en eau physiologique d'une culture en bouillon de vingt-quatre heures à 30° C de la souche pesteuse du vaccin E. V. de Girard et Robic [2]. Puis nous « pipettons » l'excédent de liquide et séchons à nouveau pendant vingt minutes à l'étuve à 30° C.

Ceci fait, au moyen d'une spatule flambée, nous découpons dans la couche de gélose un carré de la dimension approximative d'une

lamelle couvre-objet (22 mm × 22 mm), portons le carré sur une lame flambée et recouvrons d'une lamelle, elle aussi flambée et refroidie. Nous lutons à la paraffine et portons l'appareil sous le microscope à contraste de phase, en lumière verte, à un grossissement de 1 000 x.

Dans ces conditions, on peut très aisément mettre au point, directement sous la lamelle, des bacilles isolés, à raison d'un à quatre par champ. On localise aisément plusieurs de ces champs en prenant repère au moyen des verniers du chariot.

Cependant, bien que le bacille pesteux soit anaérobie facultatif, qu'il pousse convenablement à la température ambiante (25°-30° C) et que le milieu de Garber [4] convienne au départ de germes isolés, il est impossible d'assister à la division d'une seule cellule.

À la réflexion, une cause peut entrer en jeu : le contact direct du verre de la lamelle sus-jacente.

Un collègue (1) nous ayant passé quelques lamelles en matière plastique [3], nous avons repris l'expérience dans les mêmes conditions, à cela près qu'avant de couler la gélose, nous déposons au fond de la boîte une de ces lamelles, de telle sorte que le carré de gélose forme « sandwich » entre deux lamelles plastiques. Dans ces conditions, la division des cellules microbiennes se poursuit régulièrement sous l'objectif jusqu'à aboutir à un tapis uniforme étalé sur un seul plan, entre la gélose et la lamelle plastique.

La croissance de la souche E. V. de bacilles pesteux s'effectue comme suit. Après deux heures et demie d'observation, les premiers cocco-bacilles entrent en division, après s'être allongés. En prenant le bacille isolé pour unité de croissance, la moyenne de la croissance à ce temps est 1,6. Après quatre heures et demie cette moyenne passe à 4,0, puis, deux heures plus tard à 15,7 et enfin, après huit heures et demie, à 46,3.

L'ensemencement ayant été fait à 9 heures, ceci nous amène à 17 h. 30. Dès 19 h. 30, la numération des bacilles devient impossible, car ils sont à ce moment serrés les uns contre les autres dans un plan circulaire qui occupe la presque totalité du champ microscopique.

Le lendemain matin, le tapis bacillaire est entièrement confluent ; le surlendemain enfin, l'autolyse a fait son œuvre, ne laissant subsister que de nombreux granules réfringents.

Sur 34 bacilles répérés, nous en observons 5 seulement qui ne se divisent pas, soit 14,7 p. 100 de germes non viables.

Pour les 29 bacilles viables, nous arrivons à totaliser :

46	bacilles	après	2 h. 1/2,	soit	une	croissance	de.	...	1,6
116	—	—	4 h. 1/2	—	—	—	—	...	4,0
452	—	—	6 h. 1/2	—	—	—	—	...	15,7
1346	—	—	8 h. 1/2	—	—	—	—	...	46,3

Le taux global de croissance horaire est donc :

$$\mu = \log_2 x/t = \log_2 46,3/8,5 = 0,65$$

et le temps de division = $1/0,65 = 1 \text{ h. } 54 \text{ p. } 100.$

(1) Nous remercions le Dr Delville, d'Elisabethville, qui nous a signalé l'existence, et donné quelques exemplaires, des lamelles en matière plastique qui ont permis ce travail.

Si nous pointons les logarithmes à base 2 des croissances contre les temps, nous remarquons que la courbe tracée est une droite depuis le temps deux heures et demie jusqu'au temps huit heures et demie, soit :

après 2 h. $1/2 \log_2$	1,6 = 0,68
après 4 h. $1/2 \log_2$	4,0 = 2,00
après 6 h. $1/2 \log_2$	15,7 = 3,96
après 8 h. $1/2 \log_2$	46,3 = 5,53

La croissance est alors dans sa phase logarithmique et passe de 1,6 au temps deux heures et demie à 46,3 au temps huit heures et demie, soit une augmentation de $46,3 - 1,6 = 44,7$ en six heures. Le $\log_2$ de 44,7 étant : 5,48 le taux maximum de croissance est donc :

$$\mu (\max) = 5,48/6 = 0,91$$

S'il n'y avait pas eu de phase de latence au début de la culture, la croissance globale au taux maximum de 0,91 se serait opérée en 6 h. 5 p. 100 car :

$$t = \log_2 x/\mu = 5,53/0,91 = 6,05.$$

Le temps de latence, différence entre le temps réel 8 h. 30, et le temps 6 h. 5 p. 100, est donc de 2 h. 45 p. 100.

Résumons ces données :

Germes viables.	83,3 %
Taux global de croissance horaire.	0,65
Taux de croissance horaire en phase logarithmique.	0,91
Temps de division global, en heures.	4 h. 54
Temps de division pendant la phase logarithmique en heures.	1 h. 10
Phase de latence, en heures.	2 h. 45

En ce qui concerne la souche E. V. de peste, la technique décrite donne un rendement meilleur que celle de Tchan [4] lequel, procédant en goutte pendante sur germes isolés au micromanipulateur, ne trouve que 3 germes viables sur 10 et un temps de division global de quatre heures environ.

Au cours de l'essai du 6 février, nous n'avons pas assisté, du point de vue génétique, à des conjugaisons bien nettes, mais, dans un autre essai, le 13 février, nous avons vu 3 bacilles en chaînettes, nettement séparés à la sixième heure, fusionner en un long filament à la huitième heure d'observation.

Nous n'avons pas poussé les possibilités de la technique jusqu'à la cinématographie ou l'étude de l'action du bactériophage et des antibiotiques, ni jusqu'au prélèvement parallèle, sur la gélose-mère en boîte de Petri, d'empreintes successives permettant l'étude des phénomènes nucléaires, mais nous pensons que ce procédé visuel de culture peut s'adapter aisément à de telles recherches. C'est pourquoi nous avons jugé utile d'en donner connaissance.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. D. GARBER, H. WOLOCHOW et P. SMITH. *J. Bact.*, 1951, **61**, 523.
- [2] G. GIRARD et J. ROBIC. *Bull. Acad. Méd.*, 1934, **111**, 939.
- [3] Catalogue A. H. THOMAS CY. Philadelphie, 1950, n° 7029-A, p. 888.
- [4] Y. T. TCHAN. *Bull. Soc. Pathol. exot.*, 1949, **42**, 89.

ACTION DES SUBSTANCES COLORANTES SUR LES MYCOBACTÉRIES

II — COLORANTS BASIQUES (suite). INFLUENCE DU pH

par JEAN DESBORDES, Ét. FOURNIER et DENISE ALIX (*).

(Laboratoire du Service du D^r Jean Paraf.
Centre Hospitalier Emile-Roux [Brévannes].)

Continuant nos études sur l'action de différents produits colorés sur les Mycobactéries, nous avons étudié le comportement de divers germes, provenant de quelques souches de *Mycobacterium*, mis en contact avec des colorants de la série basique, à des zones différentes de pH.

Utilisant la technique décrite dans notre dernière note [4], nous avons utilisé les colorants suivants après lavage à l'alcool méthylique à 50 p. 100 :

Bleu de Nil,
Bleu de méthylène,
Rouge neutre,
Violet de méthyle.

Nous avons mis en jeu trois zones de pH différents obtenus à l'aide de solution saturée d'acide citrique (pH = 1,2), d'eau physiologique (pH = 7) et de solution saturée de CO_3Na_2 (pH = 11).

Les souches testées étaient les suivantes :

Mycobacterium tuberculosis H37 Rv,
Mycobacterium tuberculosis Boyer (souche personnelle),
BCG,
Mycobacterium minetti,
Mycobacterium phlei.

Les tableaux suivants résument nos observations. Le tableau I est relatif aux résultats obtenus en milieu acide, le tableau II en milieu neutre, et le tableau III en milieu alcalin.

La couleur des culots bactériens était observée au bout de cinq, dix, vingt, trente et soixante minutes. Certaines l'étaient au bout de douze heures.

Il ressort de l'examen de ces résultats que, si les colorants basiques sont fixés avec assez de facilité sur les bacilles, la réaction est d'autant plus rapide que le germe est plus virulent. Le phénomène est retardé en milieu acide, mais avec le temps il se produit pour quelques germes, quoique la couleur fixée soit atténuée.

C'est ainsi qu'avec les germes virulents type H37 Rv ou la souche

(*) Travail subventionné par l'Institut National d'Hygiène (professeur BUGNARD) et la Caisse Nationale de Sécurité Sociale.

Brévannes (après passage sur l'animal), lorsqu'on se place en zone alcaline, le bleu de Nil ou le rouge neutre sont fixés en moins de cinq minutes.

TABLEAU I. — Zone acide, pH 1,2.

TEMPS en minutes	BLEU DE NIL	BLEU DE MÉTHYLÈNE	ROUGE NEUTRE	VIOLET DE METHYLE
<i>H 37 Rv</i> (nom du germe).				
0.	Blanc jaune (1).	Blanc jaune.	Blanc jaune.	Blanc jaune.
5.	0	0	0	0
10.	0	0	0	0
30.	0	0	0	0
60.	0	Bleuté.	0	0
120.	Bleuté.	Bleuté.	0	0
<i>BCG</i>				
0.	Blancjaune (1).	Blanc jaune.	Blanc jaune.	Blanc jaune.
5.	0	0	0	0
10.	0	0	0	0
30.	0	0	0	0
60.	0	Bleuté.	0	0
120.	0	—	0	0
<i>M. minetti</i>				
0.	Blanc jaune (1).	Blanc jaune.	Blanc jaune.	Blanc jaune.
5.	0	0	0	0
10.	0	0	0	0
30.	0	0	0	0
60.	0	0	0	0
120.	0	0	0	0
<i>Para-tuberculeux</i> (Fléole).				
0.	Jaune ocre (1).	Jaune ocre.	Jaune ocre.	Jaune ocre.
5.	0	0	0	0
10.	0	Verdâtre.	0	0
30.	0	0	0	0
60.	0	0	0	0
120.	0	0	0	0
(1) Couleur du culot au bout d'un temps exprimé en minutes. Légende : 0 = pas de coloration du culot. différente de celle observée au temps 0.				

Avec les germes atténués (BCG), la fixation n'a lieu qu'entre cinq et dix minutes, et avec les souches avirulentes *M. minetti*, Fléole, le phénomène est encore plus lent.

Au contraire, en zone acide, il faut souvent attendre plus d'une heure, quelle que soit la souche.

On rend l'ensemble du phénomène plus sensible en diluant les solutions de colorant.

TABLEAU II. — Zone neutre, pH 7,2.

TEMPS en minutes	BLEU DE NIL	BLEU DE MÉTHYLÈNE	ROUGE NEUTRE	VIOLET DE MÉTHYLE
<i>H 37</i> <i>Rv</i> ou <i>BREVANNES</i> (nom du germe).				
0.	Blanc jaune(1).	Blanc jaune.	Blanc jaune.	Blanc jaune.
5.	0	Bleu foncé.	Rosâtre.	0
10.	Lég. bleuté.	Bleu foncé.	—	Lég. mauve.
30.	qqs. germes bleus.	—	Rose foncé.	Violacé.
60.	Bleu.	—	—	Violet.
120.	Bleu moyen.			Violet.
<i>BCG</i>				
0.	Blanc jaune(1).	Blanc jaune.	Blanc jaune.	Blanc jaune.
5.	0	0	0	0
10.	0	Bleu.	0	0
30.	Bleuté.	Bleu franc.	Rosâtre.	Mauve.
60.	Bleu clair.	Bleu foncé.	Rose franc.	Violet clair.
90.	Bleu clair.	Bleu foncé.	Rose franc.	Violet clair.
<i>M. minetti</i>				
0.	Blanc jaune(1).	Blanc jaune.	Blanc jaune.	Blanc jaune.
5.	0	0	0	0
10.	0	Bleu.	0	0
30.	Bleuté.	Bleu franc.	Rosâtre.	Mauve.
60.	Bleuté.	Bleu moyen.	Rosé.	Violet.
120.	Bleu moyen.			Violet.
[<i>Para-tuberculeux</i>				
0.	Ocre (1).	Ocre.	Ocre.	Ocre.
5.	0	0	0	Rosâtre.
10.	0	Bleu vert.	Orangé.	—
30.	qqs. germes bleutés.	Bleu franc.	Rose foncé.	Violacé.
60.	Bleu-vert.	Bleu franc.	Rose foncé.	Violet.
120.	Bleu-vert.			—
(1) Couleur du culot au bout d'un temps exprimé en minutes. Légende : 0 = pas de coloration du culot différente de celle observée au temps 0.				

On observe une différence nette avec les colorants acides, qui sont peu ou mal fixés dans des conditions expérimentales identiques [2]. Un travail en cours est consacré à cette étude et nous en publierons ultérieurement les résultats.

On peut cependant conclure des faits rapportés dans cette présente note que deux facteurs externes et un facteur interne influencent la fixation des colorants basiques sur les Mycobactéries :

1° *Le pH.* — La fixation est d'autant plus rapide que la réaction est alcaline. Il semble qu'il y ait un pH de fixation maximum pour

TABLEAU III. — Zone alcaline, pH 11.

TEMPS en minutes	BLEU DE NIL	BLEU DE MÉTHYLÈNE	ROUGE NEUTRE	VIOLET DE MÉTHYLE
<i>H 37 Rv</i>				
0	Blanc jaune (1)	Blanc jaune	Blanc jaune	Blanc jaune
5	Lég. bleu.	0	Rosé.	Mauve.
10	Bleuté.	Bleuté.	Rose rouge.	Lég. mauve.
30	Bleu grisâtre.	Bleu moyen.	Rose rouge.	Violacé.
60	Bleu grisâtre.	Bleu moyen.	Rouge.	Violacé.
120	Bleu intense.			Violacé.
<i>BCG</i>				
0	Blanc jaune (1)	Blanc jaune	Blanc jaune	Blanc jaune
5	0	0	0	0
10	Lég. bleuté.	Bleu.	Jaune.	Mauve pâle.
30	Lég. bleuté.	Bleu moyen.	Jaune.	Mauve pâle.
60	Bleu grisâtre.	Bleu moyen.	Jaune rosé.	Mauve.
90	Bleu grisâtre.	Bleu foncé.	Rose de teinte appuyé.	Mauve.
<i>M. minetti</i>				
0	Blanc jaune (1)	Blanc jaune	Blanc jaune	Blanc jaune
5	0	0	0	0
10	0	0	0	Mauve.
30	Rosé.	0	Jaune.	Violacé.
60	Teinte rosée.	Bleuté.	Jaune.	Violacé.
120	Grisâtre.			Violacé.
<i>Para-tuberculeux (Fléole)</i>				
0	Ocre (1).	Ocre.	Ocre.	Ocre.
5	0	0	0	Rosâtre.
10	0	Bleu vert.	0	
30	Rose.	Bleu moyen.	Jaune.	Violacé.
60	Rose.	Bleu moyen.	Jaune.	Violacé.
120	Rose.			Violacé
(1) Couleur du culot au bout d'un temps exprimé en minutes. Légende : 0 = pas de coloration du culot différente de celle observée au temps 0.				

chaque colorant. Ici nous avons pris des limites extrêmement larges, un seul pH en zone acide et un seul pH en zone alcaline. Mais des expériences en cours à des pH croissants extrêmement rapprochés confirment cette impression.

2° *La dilution.* — Plus le colorant est dilué, plus la fixation est rapide. Naturellement, il existe une limite à cette dilution, mais un fait est certain : une solution trop concentrée n'est pas un bon colorant.

3° *La virulence de la Mycobactérie étudiée.* — Plus la souche est virulente, plus la fixation est rapide. Comme nous l'avons déjà écrit par

ailleurs, il nous semble qu'il s'agit bien d'un phénomène d'adsorption où la phase électro-négative (acide) des couches périphériques du germe et la phase alcaline électro-positive des colorants basiques ont un rôle prépondérant, où peuvent jouer des phénomènes de concurrence entre cations (+).

C'est ainsi que des germes virulents, qui donnent une réaction bleu intense au bleu de Nil, donnent une réaction beaucoup plus faible et surtout beaucoup *plus lente* si on les met en contact au préalable avec de la streptomycine (substance basique à charge +). Un tel phénomène ne se produit pas si on place le germe au contact de l'acide nucléinique. Nous continuons nos recherches sur ces points particuliers.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. DESBORDES et Et. FOURNIER, Ces *Annales*, 1954, **86**, 657.
[2] J. DESBORDES et Et. FOURNIER (inédit).

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES SPHÉROPHOROSSES : POUVOIR PATHOGÈNE DE *SPHEROPHORUS GULOSUS*

par P. TARDIEUX, A. R. PRÉVOT et R. ROZANSKY (*).

(Institut Pasteur, Service des Anaérobies.)

En 1933, Eggerth et Gagnon [1] ont isolé de l'intestin humain 7 souches d'un anaérobie strict qu'ils ont nommé *Bacteroides gulosus* et auquel ils n'ont trouvé aucun pouvoir pathogène. Leur description, si sommaire qu'elle fût, a permis à A.-R. Prévot, en 1938, de classer cette espèce dans le genre *Spherophorus* [2]. Elle a également permis à F. Patocka et J. Laplanche, en 1947 [3] d'en identifier une souche isolée en Tchécoslovaquie par hémoculture dans un cas de septicémie mortelle survenu à la suite d'une appendicite gangréneuse sulfamido-résistante. Cette souche, outre qu'elle apportait la première notion du pouvoir pathogène de cette espèce pour l'homme, a également permis d'en connaître les caractères biochimiques. Depuis cette époque, nous avons retrouvé huit fois ce microbe à l'origine d'infections humaines graves dont 3 furent mortelles. Le tableau ci-joint indique la provenance de nos 9 souches.

Ainsi *Spherophorus gulosus* peut réaliser toutes les formes de sphérophoroses, infections causées par les diverses espèces du genre *Spherophorus* et revêtant un tableau clinique et anatomo-pathologique commun.

(*) Département de Microbiologie, Hôpital Universitaire Hadassah, Jérusalem.

N ^{os} DES SOUCHES	DATES	PROVENANCE	INFECTION HUMAINE	ASSOCIÉE A
305. . . .	1947	Tchéco-slovaquie.	Septicémie mortelle après appendicite gangréneuse sulfamido-résistante.	Pure.
445. . . .	1949	Hollande.	Septicémie.	Pure.
479. . . .	1949	Le Havre.	Méningite mortelle post-otitique.	Streptocoque anaérobique.
596. . . .	1950	Paris.	Cystite purulente.	<i>Micrococcus prevoti</i> .
885. . . .	1953	Le Havre.	Péritonite purulente d'origine obstétricale.	Pure.
916. . . .	1953	Paris.	Septicémie post-abortum compliquée de pleurésie purulente.	Pure.
1024. . . .	1954	Le Havre.	Septicémie chez une paraplégique.	Pure.
1026. . . .	1954	Strasbourg	Phlegmon gangréneux fosse ischiatique.	<i>Ramibacterium pleuriticum</i> .
1072. . . .	1954	Israël.	Arthrite suppurée du genou. Absès multiples. Mort.	<i>Proteus vulgaris</i> . <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . <i>Staphylococcus aureus</i> .

L'habitat de nos 9 souches était constitué par les cavités naturelles de l'homme, plus particulièrement l'intestin et les organes génito-urinaires ; l'infection focale primitive fut soit une appendicite, soit un traumatisme puerpéral, soit une otite ; la phase septicémique fut prouvée dans 4 cas par l'hémoculture ; les métastases furent des péritonites, des pleurésies purulentes, des méningites et des arthrites. Au sujet de cette dernière complication, l'un de nous a pu suivre de près le cas 1072, concernant une femme de 53 ans, hospitalisée à la Clinique Universitaire Hadassah de Jérusalem (Service du Dr Makin) pour une arthrite suppurée du genou droit datant de six mois et des abcès volumineux de la hanche gauche. Dans le pus de cette arthrite, on isole *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus vulgaris*. L'antibiothérapie est pratiquée. Pendant le traitement, une deuxième arthrite apparaît au genou gauche cette fois. Une ponction aseptique en retire un liquide dont la culture aérobie reste stérile et dont la culture anaérobie fournit une souche pure de *Spherophorus gulosus* qui se montre sensible surtout à l'auréomycine, à la terramycine et à la streptomycine. Par la suite, malgré l'antibiothérapie, le pus devient polymicrobien, des métastases purulentes apparaissent en divers points et la malade meurt.

Dès que nous avons pu avoir une culture de ce germe, nous l'avons inoculé au cobaye sans pouvoir provoquer la moindre lésion, ce qui est la règle pour cette espèce : aucune de nos souches n'était pathogène en culture pour cet animal ; la raison nous en a été fournie par la souche 445 isolée à Enshede en Hollande par le Dr H. Beeuwkes, d'une septicémie et de métastases purulentes. Cet auteur a pu inoculer directement au cobaye le pus du malade ; il se forma un abcès nécrotique au point d'inoculation et l'animal mourut. Le pus réinoculé en série de cobaye à cobaye reproduisit toujours une infec-

tion mortelle du même type, dont l'ensemencement permettait d'isoler chaque fois le même germe en culture pure. Mais les inoculations de ces cultures à l'animal restaient sans effet : le microbe perd son pouvoir pathogène dès qu'il est cultivé en milieu artificiel.

Discussion. — L'observation ci-dessus, comparée à celles que nous avons pu recueillir précédemment [4, 5] et à celles qui ont été publiées par divers auteurs, notamment par Lemierre, Reilly, etc., nous incite à distinguer, parmi les sphérophoroses, deux types nettement séparés par leur évolution, leur indication thérapeutique et leur pronostic.

Le premier correspond au tableau classique de la septicémie à *Spherophorus funduliformis* post-angineuse ou *post abortum* ; il est aigu ou subaigu ; souvent mortel avant l'application des sulfamides et des antibiotiques, il répond très rapidement et avec une efficacité complète au traitement pénicilliné. Aussi devient-il de plus en plus rare, l'infection étant le plus souvent jugulée avant même d'avoir atteint la phase septicémique.

Le second type, auquel se rattache notre observation, est caractérisé par une évolution subaiguë ou chronique, avec rechutes fréquentes pouvant survenir de nombreux mois après la guérison apparente. Les sulfamides et la pénicilline se montrent généralement peu actifs, ou totalement inopérants, et lorsque la guérison peut être obtenue, c'est au prix de doses maintenues longtemps à un taux très élevé.

Il est intéressant de noter que ces deux types évolutifs correspondent à une étiologie différente. L'agent des sphérophoroses aiguës est presque toujours *Spherophorus funduliformis*, quelquefois *Spherophorus pseudonecrophorus* qui en est très voisin. Toutes les autres espèces de ce genre provoquent au contraire des formes subaiguës ou chroniques, pénicillino-résistantes.

L'étude de la sensibilité *in vitro* aux antibiotiques confirme d'ailleurs le résultat des observations cliniques. Nous avons pu vérifier que 4 de nos 5 souches de *Sph. funduliformis* et 6 de nos 8 souches de *Sph. pseudonecrophorus* sont très sensibles à la pénicilline, en même temps d'ailleurs qu'à l'auréomycine, la terramycine et au chloramphénicol.

Au contraire, la plupart des souches des autres espèces et en particulier nos 9 souches de *Sph. gulosus* sont pénicillino-résistantes, alors que l'auréomycine, la terramycine et le chloramphénicol les inhibent à un taux satisfaisant.

On voit tout l'intérêt de cette constatation du point de vue de l'indication thérapeutique dans les sphérophoroses subaiguës et chroniques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] EGGERTH et GAGNON. *J. Bact.*, 1933, **25**, 389.
- [2] A.-R. PRÉVOT. *Ces Annales*, 1938, **60**, 285.
- [3] F. PATOCKA et J. LAPLANCHE. *Ces Annales*, 1947, **73**, 1206.
- [4] A.-R. PRÉVOT, E. POULIQUEN et P. TARDIEUX. *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1954, **138**, 308.
- [5] P. TARDIEUX et L. SECOND. *Ces Annales*, 1949, **76**, 543.

ÉTUDE SÉROLOGIQUE DES SOUCHES DE « *LISTERIA MONOCYTOGENES* » ISOLÉES EN FRANCE

par H. SEELIGER et G. LINZENMEIER.

(Hygiene-Institut der Universität Bonn/Rh., Deutschland

[Directeur : professeur Dr Dr EYER]).

Grâce à l'amabilité des D^{rs} Dumas et Thibault, nous avons reçu de la Collection de l'Institut Pasteur de Paris, pour examens sérologiques, 11 souches de *L. monocytogenes*, isolées en France depuis 1921.

La classification sérologique des *Listeria* s'effectue suivant les indications de Paterson [1], confirmées et simplifiées par les auteurs de cette note [2]. Le type de plus de 200 souches différentes, d'origine humaine ou animale, provenant de tous les continents, a été caractérisé par l'analyse des antigènes somatiques et flagellaires avec des sérums absorbés et spécifiques [3].

NUMÉROS	ORIGINE	SÉROTYPE
A 106	D'un coq (Forgeot, <i>Bull. Acad. vétér. France</i> , 1941, 14, 195).	1
A 107	D'un l. c. r. (Cotoni, <i>Ces Annales</i> , 1921, 35, 625; 1942, 68, 92).	4
A 108	D'une poule (Truche).	1
A 109	D'un l. c. r. au cours d'une méningite curable (M ^{lle} Mousset, 1950).	4
A 110	D'un l. c. r. au cours d'une méningite foudroyante (Arnaud, 1950).	1
A 111	Du sang du cœur d'un cobaye infecté avec une souche de virus au laboratoire du Dr Lépine (Second, 1950).	1
52.116	Souche équine (M. Belin, <i>Bull. Acad. vétér. de France</i> , 1946, 19, 176).	4
52.118	Souche ovine (M. Belin, <i>Bull. Acad. vétér. France</i> , 1943, 16, 176).	1
752.119	D'un lièvre (Vallée. <i>Ces Annales</i> , 1952, 83, 832).	atypique 4
54.54	D'un l. c. r. au cours d'une méningite mortelle (Enjalbert, 1954).	1
51.126	D'un nouveau-né (Thibault, Paris, 1951).	4

Les résultats suivants concernent uniquement des souches françaises. Le sérotype 1 a été identifié six fois; l'une des souches a réagi de façon atypique et représente peut-être une variété sérologique; les 5 autres souches appartiennent au sérotype 4.

Le tableau ci-dessus précise l'origine des souches et les conclusions de l'examen.

Les données révèlent qu'il n'existe pas de corrélation entre le type sérologique et la nature de l'origine, humaine ou animale. En outre, on ne trouve pas d'indication qu'aucun type sérologique affecte de préférence les rongeurs ou les ruminants. Ces observations confirment celles de Paterson (1940) et des auteurs (1953). La division des *Listeria* en deux groupes, capables d'infecter électivement les rongeurs ou les ruminants (Julianelle et Pons, 1939) [4] n'est donc plus justifiée et devrait être abandonnée.

La fermentation du mélécitose, positive avec le sérotype 4 et négative pour le sérotype 1 d'après Harvey et Faber [5], survenait irrégulièrement avec les souches françaises et n'avait aucune relation avec le type sérologique [6].

En résumé, le comportement physiologique et sérologique des souches de *Listeria* isolées en France, ainsi que leur distribution, correspondent exactement aux faits observés dans les pays voisins.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. ST. PATERSON. *J. Path. Bact.*, 1940, **51**, 427.
- [2] H. SEELIGER et G. LINZENMEIER. *Z. Hyg.*, 1953, **136**, 335.
- [3] H. SEELIGER. *Listeriose*. J. A. Barth édit., Leipzig (sous presse).
- [4] L. A. JULIANELLE et C. A. PONS. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1939, **40**, 364.
- [5] P. O. HARVEY et J. E. FABER. *J. Bact.*, 1941, **41**, 45.
- [6] H. SEELIGER. *Z. Hyg.*, 1954, **139**, 389.

DIFFÉRENCIATION ENTRE *TORULOPSIS* (*CRYPTOCOCCUS*) *NEOFORMANS* ET CORPS AMYLOIDES DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

par G. SEGRETAİN et M^{lle} M. COUTEAU

(Institut Pasteur, Service de Mycologie et de Physiologie végétale.)

Ayant reçu à plusieurs reprises des coupes de tissu nerveux humain dans lesquelles la présence de corps amyloïdes avait fait présumer un diagnostic de torulose, nous avons pensé qu'il n'était pas inutile de rassembler les caractères communs et différentiels que prennent les *Torulopsis* et les corps amyloïdes dans le système nerveux central de l'homme.

La dégénérescence amyloïde, ou transformation du protoplasme cellulaire en une substance voisine de l'amidon ou du glycogène, se rencontre dans divers organes ; elle est classique dans la prostate, où les « corps amylacés » ont été vus pour la première fois par Morgagni en 1723, dans les poumons, dans la muqueuse de l'appareil

urogénital, dans le système nerveux central, etc. Dans ce dernier organe, c'est Virchow qui a décrit le premier les corps amyloïdes en 1854 ; on les observe dans tout le système nerveux central, mais ils sont particulièrement nombreux dans la moelle épinière. I. Bertrand [1] note que, parmi les produits de désintégration, ce sont certainement les corps amyloïdes qui ont donné lieu aux plus vives controverses. Une étude fondamentale en a été faite en 1892 par Siegert [2], qui distingue dans ces formations :

Les *Corpora versicolorata* : Formations sphériques ou ovoïdes, à stratifications concentriques, prenant une coloration brune métachromatique par l'iode ; ce sont de beaucoup les plus fréquentes.

Les *Corpora flava* : De même forme que les précédents, mais ne donnant pas la réaction amyloïde.

La torulose est une parasitose où l'agent pathogène, un champignon levuriforme, *Torulopsis* (*Cryptococcus*) *neoformans* (San Felice) Redaelli, présente une affinité toute spéciale pour le système nerveux central [3]. La porte d'entrée du germe est soit cutanée (gomme ou tumeur), soit pulmonaire, et, quelques mois parfois quelques années après ces premiers symptômes qui peuvent passer inaperçus, le parasite se développe dans le système nerveux central. Les symptômes cliniques sont alors ceux d'une méningite subaiguë ou chronique, avec céphalée, convulsions, perte progressive de la fonction cérébrale sans fièvre le plus souvent ; l'évolution d'une tumeur cérébrale produit des symptômes tout à fait semblables. En général, le parasite se développe abondamment dans les méninges et de façon discrète dans le cerveau et la moelle, où il est rare de noter des lésions importantes. Ce n'est que très tardivement, quelques jours avant la mort, que l'on note la présence du parasite dans le liquide céphalo-rachidien, ce qui explique que bien souvent le diagnostic ne soit pas posé du vivant du malade, mais sur coupe histologique après fixation sans obtention de culture du parasite.

Pour comparer sur coupes histologiques corps amyloïdes et *Torulopsis*, nous avons disposé de deux cas de torulose humaine (fixations au Bouin) : dans l'un, l'invasion du cerveau est discrète et ne se manifeste que sous forme de 2 ou 3 lésions peu étendues au voisinage des méninges : les parasites y sont peu nombreux, groupés ou épars dans la substance cérébrale (1) ; dans l'autre cas, au contraire, la coupe intéresse une immense lésion où il ne reste plus que peu de tissu cérébral intact : les *Torulopsis* sont très nombreux (1). Les corps amyloïdes ont été mis en évidence dans deux séries de coupes du système nerveux central de l'homme ; dans l'une, les corps amyloïdes sont nombreux surtout dans la moelle [fixation au formol] (1) ; dans l'autre, ils sont rares, sauf dans une zone restreinte où leur accumulation est impressionnante (1).

La lésion histopathologique de torulose prend rarement la forme d'abcès où les cellules réactionnelles sont rares et les débris cellu-

(1) Nous remercions vivement le Dr Kirsch, directeur de l'Institut Pasteur d'Hanoi, le Dr Defresne (Haut-Katanga, Congo Belge), le Dr Benazet, Hôpital militaire d'Instruction Desgenettes, à Lyon, et le Service des Virus de l'Institut Pasteur, de nous avoir procuré le matériel de cette étude.

liaires plus ou moins abondants. Le caractère de cette lésion est beaucoup plus fréquemment celui d'un cyste ou d'une lacune où l'on ne trouve que des parasites épars dans une substance plus ou moins colorable (substance capsulaire) ; la réaction cellulaire est faible et le plus souvent nulle. Donc l'absence normale de réaction cellulaire autour des corps amyloïdes ne permet pas d'infirmer leur origine non parasitaire. Cependant les corps amyloïdes sont le plus souvent isolés : dans la moelle, ils sont disséminés, formant parfois de petits amas de 4 ou 5. Les *Torulopsis* sont en général groupés, très rarement isolés ou disséminés. Mais il existe des amas insolites de corps amyloïdes (pl. I, fig. 1).

Du point de vue morphologique, *Torulopsis neoformans* se présente *in vivo* sous forme d'une levure ronde ou légèrement ovale, nettement délimitée par une membrane et entourée par une substance capsulaire. Ses dimensions sont les suivantes : cellule+capsule : 12 à 17 μ en moyenne avec un maximum de 20 μ ; cellule seule entourée de sa membrane : 8 à 13 μ en moyenne. En culture, la morphologie du parasite est exactement la même. C'est d'ailleurs la seule espèce de champignon pathogène présentant cette morphologie et l'aspect du parasite sur coupe permet son identification générique et spécifique. Tandis que la levure et sa membrane prennent en général assez bien la coloration, la capsule souvent ne se colore pas *in vivo* sur coupe histologique ; parfois, cependant, elle prend fortement le colorant, au moins dans sa partie interne proche de la membrane cellulaire. Dans le premier cas, l'élément cellulaire central, plus ou moins fortement coloré et bien délimité par sa membrane est entouré d'une auréole non colorée, transparente. Dans le second cas, cellule et capsule sont plus ou moins uniformément colorées, formant de très gros éléments, où la membrane séparant la cellule de sa capsule se distingue parfois très difficilement. Une auréole claire, qui peut être très mince, existe le plus souvent autour de ces éléments colorés. L'existence d'éléments bourgeonnés (pl. I, fig. 4) permet d'affirmer qu'il s'agit d'une levure.

Les corps amyloïdes ont à peu près les mêmes dimensions que les *Torulopsis*, légèrement plus petits (9 à 14 μ en moyenne, maximum 18 μ) ; ils sont arrondis ou ovalaires, rarement de formes plus variables, bien délimités et inclus dans les tissus sans discontinuité (pl. I, fig. 3). On peut y voir de fines stries radiales et des zones concentriques. La coloration qu'ils prennent au centre peut être plus intense qu'à la périphérie ou légèrement différente, simulant ainsi une cellule centrale (pl. I, fig. 5, 7, 8), mais, sauf de très rares cas, on ne peut mettre en évidence, dans la masse colorée, de formation circulaire analogue à la membrane nette des *Torulopsis*. La juxtaposition de deux corps amyloïdes peut simuler un *Torulopsis* et son bourgeon (pl. I, fig. 11).

Nous avons alors cherché une coloration, qui permette, en l'absence de pratique mycologique, de distinguer sans hésitation sur coupes histologiques *Torulopsis* et corps amyloïdes. Quelques colorations usuelles en anatomie pathologique n'ont montré aucune différence d'affinité entre ces deux formations. L'hémalum colore les corps

amylôïdes en brun souvent très foncé, quelques-uns en violet clair ; les *Torulopsis* sont brun foncé ou brun rouge, la capsule, surtout dans le 2^e cas, pouvant se colorer plus ou moins intensément que le corps cellulaire (pl. I, fig. 2, 3). Avec les colorations suivantes : Giemsa, Dominici, thionine (pl. I, fig. 4, 5) et trichrome (pl. I, fig. 6, 7, 8), les différences d'affinités tinctoriales ont été faibles ou inconstantes. Certaines méthodes de coloration fréquemment employées pour les champignons n'ont pas donné de meilleurs résultats. L'imprégnation argentique de la réticuline [4] colore en noir aussi bien *Torulopsis* que corps amylôïdes. Ces deux formations prennent la même teinte violette, parfois très foncée par coloration à l'acide periodique-Schiff [5] (pl. I, fig. 1).

Nous nous sommes alors adressés aux colorants plus spécifiques des corps amylôïdes et avons suivi les techniques préconisées par I. Bertrand [4] ou M. Langeron [6]. Le Soudan III-vert lumière, qui ne colore pas les corps amylôïdes, peut colorer fortement en bleu vert la capsule des *Torulopsis*, cependant certains de ceux-ci prennent à peine le colorant. Le violet cristal en solution alcoolique à 5 p. 100 (technique de Lieb) nous a donné une assez belle métachromasie rouge violacée des corps amylôïdes alors que les *Torulopsis* se coloraient en violet comme le fond. Mais nous n'avons pu reproduire ce phénomène sur toutes nos coupes et cette métachromasie s'est montrée assez fugace ; elle ne s'est pas produite en employant le violet cristal suivant la technique de Muller. Le carmin de Best colore en rose rouge les deux formations. La capsule de *Torulopsis neoformans* peut se colorer fortement en bleu vert par le sulfate de bleu de Nil, et le montage dans la vaseline fait apparaître autour de la capsule une nouvelle auréole à peine teintée séparée de la capsule par une ligne circulaire nette. La cellule centrale peut prendre une teinte violacée plus ou moins intense. Les corps amylôïdes sont alors bleu clair bien délimités ; certains *Torulopsis* qui prennent mal le colorant, sont absolument semblables.

La méthode la plus simple et la meilleure, qui permet de différencier *Torulopsis* et corps amylôïdes (*Corpora versicolorata*), est d'employer l'iode. Nous avons utilisé la technique de Langhans que nous reproduisons ici :

Sur les coupes déparaffinées, laisser agir pendant dix minutes la solution suivante [selon W. H. F. Addison] (2) :

Alcool 95°	150 cm ³
Eau distillée.	150 cm ³
Iode cristallisée	1,5 g
Iodure de potassium.	3 g
Chlorure de sodium	1,5 g

Rejeter l'excès de colorant, monter dans la vaseline (ou la glycérine) en lutant la lamelle.

Les *Torulopsis* ne se colorent pas, mais la capsule prend une refrin-

(2) La solution de Lugol, employée pour le Gram, peut déjà donner un premier résultat.

gence très forte et avec le milieu de montage il existe, comme pour le bleu de Nil, une auréole autour de la capsule et bien distincte de celle-ci (pl. I, fig. 9, 10). Les corps amyloïdes apparaissent sur le fond à peine coloré en jaune, comme des taches d'un brun plus ou moins foncé : les plus colorés sont bien délimités ; à travers les plus clairs, qui ont un contour peu net, on peut apercevoir le tissu cérébral [il semble qu'on assiste là à la naissance d'un corps amyloïde normal] (pl. I, fig. 11, 12).

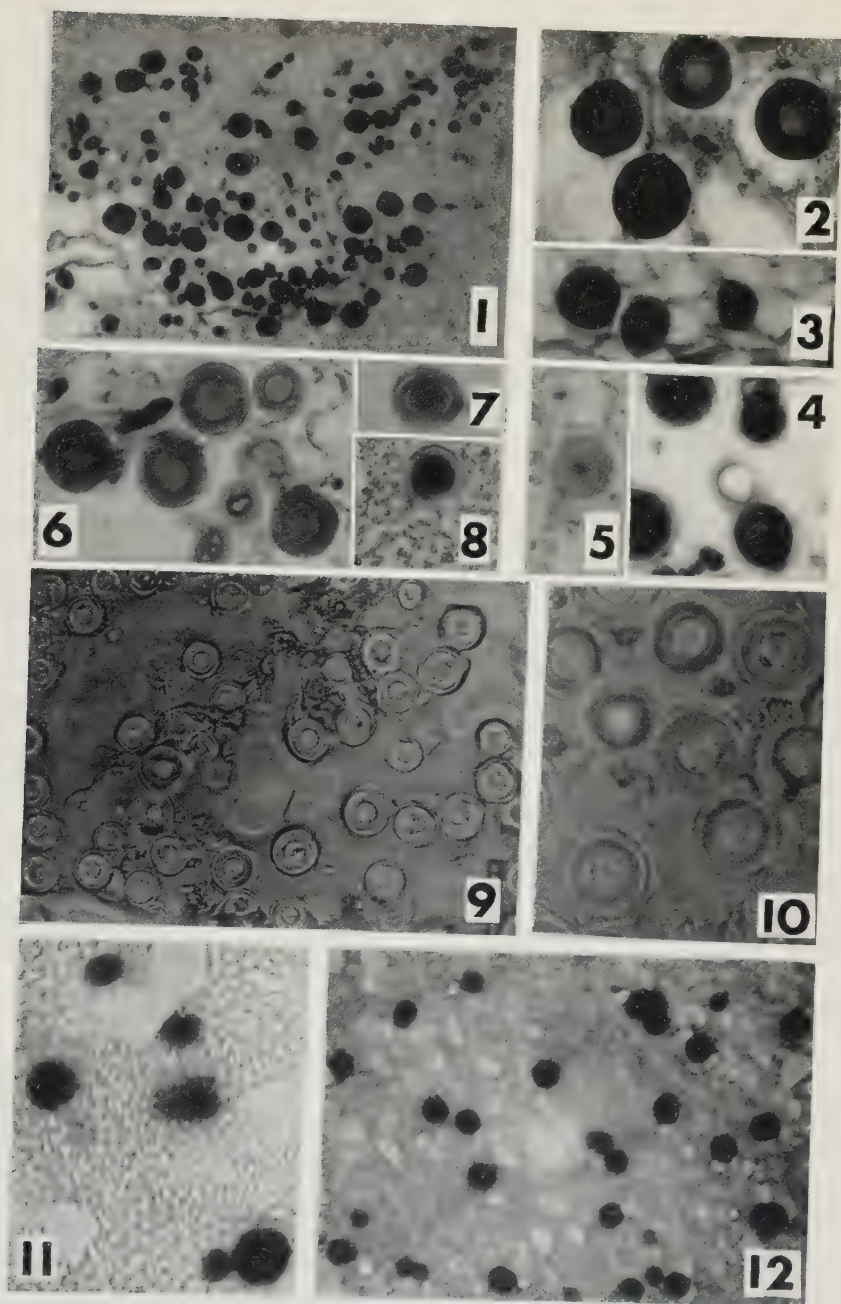
En résumé, sur des coupes de tissu nerveux humain, la présence de *Torulopsis* prenant bien le colorant permet un diagnostic aisé ; mais s'ils se colorent mal, et surtout devant des corps amyloïdes particulièrement nombreux, le doute pourra être levé par la coloration à l'iode qui permet une distinction facile entre *Torulopsis neoformans* et corps amyloïdes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] I. BERTRAND. *Techniques histologiques de Neuropathologie*. Masson édit., Paris, 1930.
- [2] F. SIEGERT. *Archiv. path. Anat. Phys.*, 1892, **429**, 513.
- [3] G. SEGRETAIN et E. DROUHET. *Ces Annales*, 1947, **73**, 1161.
- [4] G. DEZEST. *Ces Annales*, 1953, **85**, 131.
- [5] A. M. KLIGMAN et H. MESCON. *J. Bact.*, 1950, **60**, 415.
- [6] M. LANGERON. *Précis de Microscopie*. Masson édit., Paris, 1942.

LÉGENDE DE LA PLANCHE

- 1. Amas de corps amyloïdes (acide periodique-Schiff; $\times 325$)
- 2. Cellules et capsules de *Torulopsis*, colorées à l'hémalun ($\times 750$).
- 3. Corps amyloïdes colorés à l'hémalun ($\times 750$).
- 4. Forme bourgeonnante de *Torulopsis* (thionine; $\times 750$).
- 5. Corps amyloïdes; zones centrale et périphérique distinctes (thionine; $\times 750$).
- 6. *Torulopsis* : cellule et capsule séparées par la membrane (trichrome; $\times 750$)
- 7 et 8. Corps amyloïdes ressemblant aux *Torulopsis* (trichrome $\times 750$).
- 9. *Torulopsis* coloration à l'iode, montage à la vaseline : cellule, capsule et auréole autour de la capsule ($\times 325$).
- 10. *Torulopsis* coloration à l'iode, montage à la vaseline : cellule, capsule et auréole autour de la capsule ($\times 750$).
- 11. Corps amyloïdes, coloration à l'iode : on aperçoit le tissu nerveux à travers les taches les plus pâles; deux corps simulent un bourgeonnement ($\times 750$).
- 12. Amas de corps amyloïdes colorés à l'iode dans la moelle épinière ($\times 325$).



AU SUJET DES DIFFÉRENTS TYPES DE SALMONELLES AVIAIRES

par B. VIRAT, A. VALLÉE et H. JACOTOT

(*Institut Pasteur. Service de Microbiologie Animale.*)

On a depuis longtemps cherché à différencier par un procédé fidèle les germes de la typhose et de la pullorose aviaires. En effet, cette distinction n'était pas sans présenter un certain intérêt, du point de vue de la taxonomie sans doute, mais surtout du point de vue de la pathologie et sur le plan de l'épizootologie. En l'absence de réactions sérologiques permettant leur discrimination on s'adressa généralement au comportement de ces germes vis-à-vis de certains glucides. Des études, parfois contradictoires, aboutirent à différentes classifications qui n'eurent qu'un succès éphémère. La question laissée en sommeil pendant de nombreuses années fut reprise par Lucas et ses collaborateurs qui lui consacrèrent en 1951 une étude très complète [1]. C'est ce travail et les conclusions que leurs auteurs en tirèrent qui nous incitèrent à entreprendre à notre tour l'examen systématique de 196 souches isolées au service de Microbiologie Animale de l'Institut Pasteur, au cours des années 1950 à 1954, dans le but essentiel de contrôler la stabilité des différents types biochimiques établis. Cette étude se rapproche de celle effectuée récemment par Néel, Le Minor et Taslimi [2] ; elle aboutit d'ailleurs à des résultats souvent comparables.

Nous avons limité nos recherches au comportement biochimique de nos souches vis-à-vis des quatre glucides qui semblaient présenter le plus grand intérêt pour cette étude, à savoir : la dulcité, le maltose, le xylose et le rhamnose. Les milieux furent toujours préparés suivant la technique classique utilisée pour l'étude des entérobactériacées (indicateur : bleu de bromothymol). Chaque souche fut soumise à deux ou plusieurs examens pratiqués à plusieurs semaines d'intervalle sans avoir subi de repiquage en milieu artificiel. Seuls la durée de conservation et certains facteurs extérieurs tels que la température ont donc pu exercer leur action sur le comportement de nos souches.

Nous ne rapporterons pas ici les résultats statistiques de cette étude, en effet la répartition de nos souches, d'une part dans les différents types, d'autre part suivant l'âge des animaux chez lesquels elles furent isolées, est presque identique à celle établie par Lucas et ses collaborateurs. Une seule différence notable : alors que Lucas signale que toutes ses souches de *S. gallinarum* type C (31) ont été isolées chez des poussins, 7 sur 15 du même type que nous avons isolées l'ont été chez des adultes et 8 chez des poussins.

Afin de simplifier cet exposé nous avons adopté comme classification

de base celle de Lucas ainsi que la notation suivante valable pour les quatre glucides étudiés :

Dulcite virée en n jours $D = + n$
 Dulcite inchangée après 15 jours d'étuve. $D = 0$

I. APPARITION, SOIT A L'ISOLEMENT, SOIT APRÈS UN CERTAIN DÉLAI DE CONSERVATION A LA TEMPÉRATURE DU LABORATOIRE EN AMPOULES SCELLÉES DE TYPES NE FIGURANT PAS DANS LA CLASSIFICATION DE LUCAS. — Cinq types nouveaux, 2 de *S. pullorum* ($D = 0$) et 3 de *S. gallinarum* ($D = + n$) ont pu ainsi être établis :

a) *S. pullorum*. — Trois cultures nous ont donné les résultats suivants :

$D = 0$ $M = + 1-6$ $X = + 1-4$ $R = + 1-4$ (*pullorum* type IV').

Une culture nous a donné les résultats suivants :

$D = 0$ $M = + 10$ $X = 0$ $R = 0$ (*pullorum* type IV'').

b) *S. gallinarum*. — Deux cultures nous ont donné les résultats suivants :

$D = + 1$ $M = + 4-6$ $X = 0$ $R = 0$ (*gallinarum* type C').

Deux cultures nous ont donné les résultats suivants :

$D = + 1$ $M = 0$ $X = 0$ $R = + 4-9$ (*gallinarum* type B').

Une culture nous a donné les résultats suivants :

$D = + 1$ $M = 0$ $X = 0$ $R = 0$ (*gallinarum* type B'').

II. PASSAGES D'UN TYPE BIOCHIMIQUE A UN AUTRE APRÈS CONSERVATION A LA TEMPÉRATURE DU LABORATOIRE EN AMPOULES SCELLÉES.

Souche 472/50	<i>pullorum</i> IV'.	<i>pullorum</i> I.
Souche 506/50	<i>pullorum</i> IV'.	<i>pullorum</i> I.
Souche 527/50	<i>gallinarum</i> C.	<i>gallinarum</i> A.
Souche 561/50	<i>pullorum</i> I.	<i>pullorum</i> II.
Souche 227/51	<i>gallinarum</i> A.	<i>pullorum</i> IV'.
Souche 405/51	<i>gallinarum</i> C.	<i>gallinarum</i> B.
Souche 511/51	<i>gallinarum</i> C.	<i>gallinarum</i> A.
Souche 585/51	<i>gallinarum</i> C'.	<i>gallinarum</i> B', <i>gallinarum</i> B'', <i>gallinarum</i> B.
Souche 378/52	<i>gallinarum</i> C.	<i>gallinarum</i> A.

III. HISTOIRE DE 5 SOUCHES ISOLÉES DANS LE MÊME ÉLEVAGE EN MARS, NOVEMBRE ET DÉCEMBRE 1952 ET EN JANVIER 1954 (SOUCHES G...c). — Tous ces isollements ont été faits chez des poussins.

a) Souche 98/52 (6 mars 1952) : *pullorum* IV présentant les caractères cultureux d'un *gallinarum*. A la suite d'un deuxième examen le maltose resta inchangé (*pullorum* III), puis fut de nouveau viré au cours de quatre examens ultérieurs.

b) Souche 399/52 (20 novembre 1952) : *gallinarum* C présentant les caractères cultureux d'un *gallinarum*. A la suite d'un troisième

examen la dulcité ne fut plus virée (*pullorum* IV), mais le fut à nouveau au quatrième examen.

c) *Souches 400/52 et 400 bis/52 (1^{er} décembre 1952)* : ces deux souches furent isolées chez deux poussins provenant du même lot ; elles présentaient toutes deux les caractères culturels d'un *gallinarum*. La première (400/52) avait le comportement biochimique d'un *pullorum* III, mais par la suite attaqua le maltose (*pullorum* IV). La seconde (400 bis/52) se présenta comme un *pullorum* IV et ne varia pas.

d) *Souche 10/54 (12 janvier 1954)* : présentait les caractères culturels d'un *pullorum* et a donné les réactions biochimiques suivantes :

$$D = O \quad M = +10 \quad X = O \quad R = O \quad (\text{pullorum IV}).$$

Signalons en outre que la souche 98/52 appartenait au type sérologique « Variant » (présence de l'antigène XII₂), mais que les examens ultérieurs ne permirent pas de retrouver ce caractère antigénique.

IV. TRANSFORMATION D'UN TYPE BIOCHIMIQUE PAR PASSAGE EN ŒUF DE POULE EMBRYONNÉ. — Deux souches de *S. gallinarum* (type A et type C) ont subi 30 passages en œuf embryonné. Au cours de ces 30 passages, la souche de type A ne subit aucune modification dans son comportement biochimique. Au contraire, au dix-neuvième passage, la souche C commença à virer le xylose, présentant ainsi les caractères d'une souche de type A, caractères qui se sont conservés par la suite.

V. RAPPORT ENTRE LE CARACTÈRE MORPHOLOGIQUE DES CULTURES ET LEUR ACTION SUR LA DULCITE ET LE MALTOSE. — Au cours de l'étude de nos souches nous nous sommes spécialement attachés à l'examen des caractères culturels et notamment à l'aspect des colonies sur gélose inclinée. Nous avons utilisé pour cette étude une gélose peptonée contenant 40 p. 1 000 de sérum formolé. Nous avons observé dans ces conditions deux sortes de colonies : les unes assez grosses, opaques, blanchâtres et crémeuses, les autres beaucoup plus petites et presque translucides. La différence entre ces deux sortes de colonies était très nette après quarante-huit heures d'étuve. On trouvera dans le tableau suivant la répartition de nos souches, d'une part dans ces deux types

ANNÉES	NOMBRE de souches	PETITES COLONIES				GROSSES COLONIES			
		M = +	D = +	M = O	D = O	M = +	D = +	M = O	D = O
1950.	64	0	0	4	4	60	60	0	0
1951.	46	0	0	6	6	40	40	0	0
1952.	49	0	0	19	19	30	26	0	4*
1953.	24	0	0	15	15	9	9	0	0
1954.	13	0	0	11	11	2	2	0	0
	196	0	0	55	55	141	137	0	4

* = Ces quatre souches appartiennent au groupe des souches G... c dont nous avons parlé plus haut (voir III).

cultureaux, d'autre part suivant leur réaction sur la dulcité et le maltose.

Il résulte de cette comparaison qu'il y a une corrélation presque parfaite entre l'aspect des colonies sur gélose peptonée-sérum formolé et l'action des souches de salmonelles aviaires sur la dulcité et le maltose. En effet, 100 p. 100 des souches fournissant de petites colonies n'ont viré ni la dulcité ni le maltose et 97 p. 100 des souches fournissant de grosses colonies ont viré à la fois dulcité et maltose.

Il ressort des résultats que nous venons d'exposer :

1° Que des types autres que les 7 types décrits par Lucas et ses collaborateurs peuvent être identifiés.

2° Que la stabilité de ces types biochimiques est loin d'être parfaite.

3° Que des types différents ayant vraisemblablement la même origine peuvent se rencontrer dans un même élevage.

4° Qu'il y a un rapport constant entre les caractères cultureaux des souches de salmonelles aviaires et leur comportement vis-à-vis de la dulcité et du maltose.

Il semble bien, dans ces conditions, qu'une classification où l'on voudrait faire entrer tous les types ou sous-types rencontrés ne se justifie pas. En effet, ces variétés se présentent la plupart du temps comme des cas d'espèce, elles sont très instables du point de vue biochimique et enfin leur distinction présente peu d'intérêt sur le plan épizootologique. Il est à redouter qu'une telle classification n'aboutisse à une confusion allant à l'encontre du but recherché.

Au contraire, nous pensons qu'il est souhaitable de continuer à distinguer les deux types principaux, *S. pullorum* et *S. gallinarum*, en raison des différences importantes existant entre eux tant du point de vue bactériologique (caractères cultureaux et biochimiques) que du point de vue pathologique (84 p. 100 de *S. gallinarum* chez les adultes, 75 p. 100 de *S. pullorum* chez les poussins), bien que l'électivité de *S. gallinarum* pour l'adulte et de *S. pullorum* pour le poussin soit moins constante qu'autrefois, ce qui résulte peut-être de ce qu'ils s'adaptent lentement, le premier à l'organisme du poussin, le second à l'organisme de la poule.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. LUCAS, L. ANDRAL, G. BOULEY, A. PARAF et C. QUINCHON. *Rec. Méd. Vétér.*, 1951, **127**, 547.
- [2] R. NEEL, L. LE MINOR et H. TASLIMI. Soc. Franç. de Microbiologie, séance du 7 octobre 1954.

GERBILLUS HIRTIPES LATASTE, NOUVEAU RONGEUR DE LABORATOIRE

par C. VERMEIL.

Note présentée par M. DUMAS.

(Institut Pasteur de Tunis.)

Ce petit rongeur saharien de couleur claire (famille des *Muridae*, sous-famille des *Gerbillinae*) appartient à un genre dont plusieurs espèces ont déjà fait l'objet d'investigations expérimentales.

Les espèces rencontrées en Tunisie (1), étudiées depuis quelques années, se sont révélées sensibles expérimentalement à plusieurs ultravirus et rickettsies (virus de la grippe et de la poliomyélite, rickettsies du typhus exanthématique, de la fièvre boutonneuse, de la fièvre pourprée, ces germes étant inoculés par voie respiratoire, sauf le virus de la poliomyélite type Lansing inoculé par voie cérébrale) et au protozoaire *Plasmodium berghei*.

Les gerbilles égyptiennes seraient un matériel de choix pour l'entretien de souches de *Schistosoma*.

Plus récemment, *Gerbillus hirtipes* a été reconnue sensible aux agents des mycoses viscérales, à certaines catégories de protozoaires, tels que *Leishmania donovani* (ces essais en cours d'étude). De même P. Durand a vu que les gerbilles, plus sensibles que le cobaye à *Leptospira icterohemorrhagiae*, meurent aussi après inoculation de certains types de leptospires d'origine bovine qui ne tuent pas le cobaye.

A notre connaissance, les diverses gerbilles utilisées pour l'expérimentation provenaient seulement d'exemplaires capturés, jusqu'au moment où nous avons réussi l'élevage de *Gerbillus hirtipes*. Nous aurions donc, avec ce rongeur, inauguré l'élevage régulier et en série d'une espèce de ce groupe.

Bien que *Gerbillus hirtipes* soit rencontrée dans le secteur pré-saharien de Tunisie, la souche que nous entretenons au laboratoire provient d'animaux capturés dans le Sahara libyen au mois de juin 1951. En un peu plus de trois ans cet élevage est à la dixième génération environ.

Conditions de l'élevage. — A l'Institut Pasteur de Tunis, *Gerbillus hirtipes* est élevée dans des locaux peu éclairés, ce qui doit convenir à ce rongeur d'activité nocturne. Les locaux sont chauffés l'hiver et

(1) Les gerbilles tunisiennes sont représentées par les espèces suivantes : *Gerbillus hirtipes* Latas., *Gerbillus eatoni latastei* Th. et Troues., *Dipodillus campestris* Levaill., *Dipodillus dodsoni* Th., *Gerbillus pyramidum* F. Cuv., *Gerbillus gerbillus* Ol., *Dipodillus garamantis* Lat.

présentent l'été une protection suffisante à l'excès de chaleur et de sécheresse.

Les cages utilisées (0,55 m × 0,45 m × 0,45 m) sont en contreplaqué grillagé à l'intérieur sur une hauteur de 0,20 m. Les cages servent soit à la reproduction (1 couple par cage), soit à l'isolement des jeunes, soit au groupement des adultes utilisables (8 à 10 par cage). Ces cages sont stérilisées périodiquement tous les trois mois pour éliminer totalement les parasites. Nous avons environ 30 cages dans le même local.

Nourriture. — Les graines de céréales courantes conviennent : blé, orge. Les carottes avec leurs feuilles constituent un apport alimentaire indispensable et doivent être données en régime constant. Les carottes évitent de donner de l'eau. On peut ajouter quelques dattes, un des aliments naturels de ces rongeurs. La litière est faite d'herbes variées. Cette nourriture, bien qu'uniforme, n'a pas été modifiée, les rongeurs ne présentant ni signes de carence, ni baisse de leur reproduction. Les gerbilles supportent bien une réduction passagère de leur alimentation.

Elevage proprement dit. — Les gerbilles sont aptes à la reproduction dès l'âge de 6 à 8 semaines ; le couple formé est isolé dans une cage, le mâle laissé jusqu'à la naissance des petits, car il est difficile de juger l'état de gravidité des femelles. Après la naissance des petits, le mâle est alors isolé et peut servir à féconder une nouvelle femelle.

Le cycle œstral, étudié par la méthode des frottis vaginaux, est habituellement de cinq jours, mais présente des irrégularités (écarts minima et maxima : quatre et huit jours).

La durée de la gestation est de vingt-cinq jours en moyenne.

Les portées sont en moyenne de 4 petits ; 6 petits sont un maximum rarement vu.

Les petits pèsent à la naissance 2,5-3 g (poids d'une femelle adulte : 55 g), ils sont glabres, assez actifs et mangent de la nourriture solide vers le dixième jour.

Nous séparons les petits de leur mère vingt-cinq à trente-cinq jours après leur naissance. Nous groupons pour ensuite les séparer à maturité sexuelle évidente, en lots de mâles et de femelles.

La mère, libérée de sa portée grandie, est remise en contact avec le mâle. Nous remplaçons les femelles reproductrices au bout de 8 à 10 portées. Il arrive parfois que, même après 1 ou 2 parturitions, une femelle demeure vide après deux mois de cohabitation avec le mâle : ces femelles sont éliminées et remplacées par d'autres reproductrices.

Caractéristiques générales. — Les gerbilles doivent être saisies avec précaution, le revêtement de l'extrémité de la queue, très fragile, se rompt facilement. Bien que l'élevage en soit arrivé à la dixième génération, les animaux sont toujours aussi vifs, batailleurs et agressifs. Les gerbilles font des bonds de 25 cm de haut, ce qui explique la taille des cages. Quelques exemplaires ont présenté une tendance à la dépigmentation des phanères, mais nous ne sommes pas arrivé à isoler une souche présentant régulièrement cette anomalie.

Nous n'avons pas remarqué d'épizooties particulières à cette espèce en cours d'élevage ; le pourcentage des pertes reste bas, inférieur à 10 p. 100 des naissances.

Bien que nous n'en ayons pas établi la preuve expérimentale, les gerbilles ne paraissent pas susceptibles d'être contaminées par les salmonelles de souris.

Résumé. — L'auteur a réussi l'élevage au laboratoire d'une gerbille (*Gerbillus hirtipes* Lataste). Ce rongeur offre d'intéressantes possibilités pour l'étude de certaines viroses, rickettsioses et parasitoses.

BIBLIOGRAPHIE

- M. ABDEL-AZIM et S. G. COWPER. *Brit. J. exp. Path.*, 1950, **31**, 577.
W. CHOUMOWITCH. *Bull. Soc. Sci. nat. Tunisie*, 1954, **7**, 81.
J. DUMAS. *Les animaux de laboratoire*. 1^{re} édit., Paris, 1953, Flammarion, édit.
P. DURAND et H. SPARROW. *Arch. Inst. Past. Tunis*, 1940, **29**, 1.
P. DURAND, P. GIROUD et H. SPARROW. *Arch. Inst. Past. Tunis*, 1940, **29**, 228.
P. DURAND. *C. R. Soc. Biol.*, 1945, **139**, 716.
P. DURAND et M. MATHIS. *Tunisie Médicale*, 1951, **29**, 699.
C. VERMEIL, A. GORDEIEFF et N. HADDAD. *Ces Annales*, 1954, **86**, 636.
A. WASSILIEFF. *Arch. Inst. Past. Tunis*, 1932, **21**, 298.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Activité antimicrobienne de certains composés chimiques étudiée au moyen du microbiophotomètre, par M. FAGUET.

Etude d'une colicine élaborée par une culture de « *S. paratyphi* » B, par Y. HAMON.

Contribution à l'étude de la virulence et du pouvoir toxigène du vibron cholérique. I. Influence de la température d'incubation sur la virulence expérimentale de « *Vibrio cholerae* » (Ogawa), par A. JUDE et J. GALLUT. **II. Influence de la température d'incubation sur le pouvoir toxigène « in vitro » de « *Vibrio cholerae* » (Ogawa)**, par J. GALLUT et A. JUDE.

Action de la fungicide (nystatine ou mycostatine) sur « *Candida albicans* » et d'autres champignons levuriformes « in vitro » et « in vivo », par E. DROUHET.

Etude de la biochimie de la sporulation chez « *Bacillus megaterium* ». I. Composition des spores obtenues par carence des différents substrats carbonés, par M^{lle} R. TINELLI.

Etudes sur la toxine R2 du bacille typhique. IV. Propriétés immunologiques des différentes fractions obtenues (réactions de précipitation et de déviation du complément), par M^{lle} M. DIGEON, R. MANGALO, A. TURPIN et M. RAYNAUD.

Action de divers sérums sur des toxines botuliques, par M^{lles} M. GUILLAUMIE, A. KREGUER et M^{me} M. GEOFFROY.

LIVRES REÇUS

Rapport sur la première conférence internationale des commissions nationales de statistiques démographiques et sanitaires. Organisation Mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques, n° 85, 30 p. Prix : Fr. fr. 80, Fr. s. 1,- -, 1 s. 9 d., ou \$ 0,25 (dépositaire pour la France : Librairie Masson, 120, boulevard Saint-Germain, Paris-6°).

Comité d'experts de l'assainissement. Troisième rapport. Organisation Mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques, n° 77, 29 p. Prix : Fr. fr. 80, Fr. s. 1,- -, 1 s. 9 d., ou \$ 0,25 (dépositaire pour la France : Librairie Masson, 120, boulevard Saint-Germain, Paris-6°).

Méthodes à appliquer pour l'élaboration d'un plan coordonné d'action sanitaire dans les zones rurales. Comité d'experts de l'administration de la Santé publique. Deuxième rapport. Organisation Mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques, n° 83, 50 p. Prix : Fr. fr. 80, Fr. s. 1,- -, 1 s. 9 d., ou \$ 0,25 (dépositaire pour la France : Librairie Masson, 120, boulevard Saint-Germain, Paris-6°).

J. C. Carothers. — *Psychologie normale et pathologique de l'Africain. Etude ethno-psychiatrique. Organisation Mondiale de la Santé : Série de Monographies, n° 17, 200 p. Prix : Fr. fr. 640, Fr. s. 8,- -, 13 s. 6 d., ou \$ 2,00 (dépositaire pour la France : Librairie Masson, 120, boulevard Saint-Germain, Paris-6°).*

La sous-alimentation et la malnutrition chez les mères, les nourrissons et les enfants. Troisième rapport du Comité mixte FAO/OMS d'experts de l'Alimentation et de la Nutrition. Organisation Mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques, n° 72, 32 p. Prix : Fr. s. 0,80, Fr. fr. 65, 1 s. 6 d., \$ 0,20 (dépositaire pour la France : Librairie Masson, 120, boulevard Saint-Germain, Paris-6°).

Premier rapport du Comité d'Experts des Maladies rhumatismales. Organisation Mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques, n° 78, 27 p. Prix : Fr. fr., 80 ; Fr. s., 1 ; 1 sh 9 d. ; \$ 0,25 (dépositaire, Masson et C^{ie}, 120, boulevard Saint-Germain, Paris).

Le Comité d'Experts des Maladies rhumatismales procède à un rapide examen des maladies rhumatismales chroniques sur le plan international. Il montre combien il serait nécessaire de faire des études statistiques sur l'incidence et la prévalence de ces maladies et formule des suggestions sur la marche à suivre pour organiser ces études de la façon la plus efficace. Les renseignements ainsi obtenus devraient permettre de tirer d'importantes conclusions touchant l'étiologie et la

pathogénie de ces affections et, par là même, faciliter la prophylaxie et le traitement.

Ce rapport attire l'attention sur un groupe de maladies qui sont d'importantes causes d'invalidité prolongée et qui, par conséquent, posent des problèmes sociaux et économiques aussi bien que sanitaires. Il met l'accent sur les lacunes de notre connaissance des maladies rhumatismales et souligne ce qui pourrait être fait pour que la médecine accorde à ces maladies l'importance qu'elles méritent.

H. T.

H. J. Flechtner. — *Gesundheit durch Krankheit*. 1 vol., 352 p., 16 pl. hors texte, Econ-Verlag, Düsseldorf, édit. Prix : D. M. : 14,80.

« La santé par la maladie » est une étude de l'immunité et de ses bienfaits. C'est une revue très générale, qui ne s'adresse pas aux spécialistes, mais qui examine tous les différents aspects de la question : définition de l'immunité, étude de la maladie infectieuse et de l'agent pathogène, lutte de l'organisme contre le micro-organisme qui l'envahit, étude des antigènes et des anticorps, immunité active et immunité passive, et enfin sensibilisation, allergie et anaphylaxie.

H. T.

Techniques de Laboratoire. 2^e édition. Tome I : *Chimie physique-Chimie biologique*. 1 vol. 930 p., 202 fig. Prix broché : 4 200 fr., cartonné toile : 4 800 fr. Tome II : *Chimie clinique*, 1 vol. 444 p., 33 fig. Prix broché : 2 400 fr., cartonné toile : 3 000 fr., Masson édit., Paris 1954.

Ces deux volumes, publiés sous la direction de J. Loiseleur, sont l'œuvre de plusieurs collaborateurs, chacun d'entre eux étant spécialiste de la question qu'il traite. Cette seconde édition a été entièrement revue et complétée des nouveautés intervenues depuis la première édition ; on notera, en particulier, qu'elle comporte 13 chapitres nouveaux. La chimie biologique fait des appels si fréquents aux techniques de la chimie physique que leurs frontières ont cessé d'exister. Quant à la chimie clinique, elle doit bénéficier de toutes les acquisitions de la chimie biologique.

H. T.

The discovery of unicellular life. Excerpts from Communications by Antoni van Leeuwenhoek to the Royal Society of London. 1 vol., 15 pages. Chronica Botanica C^o, édit., Waltham, U. S. A.

Tous les microbiologistes seront intéressés par ces deux extraits des lettres que Leeuwenhoek adressa à la Royal Society de Londres et qui relatent les remarquables découvertes qu'il fit avec son microscope primitif. L'éditeur des Chronica Botanica offre gracieusement à ceux qui lui en feront la demande ce petit opuscule. Les lettres d'Antoni van Leeuwenhoek dont il est tiré forment plusieurs volumes *in quarto*, luxueusement édités et brillamment illustrés, dont quatre ont déjà paru, la préparation des deux autres étant très avancée. Les prix de ces quatre volumes, publiés par N. V. Swets et

Zeitlinger, Amsterdam, sont : vol. I, \$ 10,80 ; vol. II, \$ 11,20 ; vol. III, \$ 13,50 ; vol. IV, \$ 15,50.

H. T.

Atti della Societa Italiana delle Scienze Veterinarie. Vol. VII. 1 vol., Stab. Grafico Fratelli Lega, Faenza, Ital., 1953.

Cet ouvrage reproduit *in extenso* toutes les communications qui ont été présentées au VII^e Congrès de la Société Italienne des Sciences Vétérinaires qui s'est tenu à Cortina d'Ampezzo du 28 au 31 août 1953. Ces communications sont très nombreuses et se répartissent en deux grandes sections : anatomie normale et anatomie pathologique. Une table par matières et une table par auteurs permettent de retrouver aisément les sujets cherchés.

H. T.

Autotrophic microorganisms. 1 vol., 305 p., Cambridge University Press édit., 1954. Prix : 25 shillings.

Comptes rendus du IV^e Symposium de la Society for general Microbiology qui s'est tenu à Londres en avril 1954. Treize communications ont été présentées à ce Symposium ; elles étudient les divers aspects de la physiologie et de la biochimie des bactéries autotrophes, les mécanismes de la photosynthèse, les différences et les rapports entre bactéries autotrophes et bactéries hétérotrophes, etc.

H. T.

R. B. Fisher. *Protein Metabolism*. 1 vol. 198 p., Methuen and Co, Londres, et John Wiley and Sons, New-York, édit. Prix : 11 sh., 6 d.

Ce petit volume est le quatrième de la nouvelle série de monographies sur des questions de biochimie destinées à donner au lecteur une vue d'ensemble des toutes dernières découvertes sur les sujets qu'elles traitent. Il était difficile d'embrasser toute la question du métabolisme des protéines dans un ouvrage d'aussi petit format et les auteurs s'excusent d'avoir dû effleurer seulement quelques points importants. Ils étudient la digestion et l'absorption des protéines, les processus de désamination et de transamination, les aspects généraux du métabolisme des acides aminés, l'emploi des isotopes dans l'étude du métabolisme des protéines et enfin la valeur nutritive des diverses protéines.

H. T.

H. O. J. Collier. — *Chemotherapy of infections*. 1 vol. 248 p., 53 fig. Chapman et Hall édit., Londres, 1954. Prix : 18 shillings.

Ce petit livre passe assez rapidement en revue toute la question de la chimiothérapie et des antibiotiques, envisagée sous l'angle des réactions entre les agents infectieux, l'homme qu'ils infectent et les substances chimiques qui les détruisent. Il ne dissimule pas les limites et même les inconvénients de la chimiothérapie qui peut, non seulement se révéler toxique dans ses effets sur les malades, mais même, dans certains cas, augmenter la virulence de certains microbes.

H. T.

Houben-Weyl. — *Methoden der organischen Chemie*. 4^e édition complètement remise à jour ; vol. VII, première partie : Les aldéhydes, 556 pages. Georg Thieme, édit., Stuttgart, 1954. Prix : D. M. 73,80.

Les différents volumes constituant les « Methoden der organischen Chemie » continuent à paraître à intervalles réguliers et rapprochés. Le tome VII, qui vient de faire son apparition en librairie, devait primitivement être consacré aux fonctions carbonylées et à leurs dérivés.

En fait, par suite des développements récents dans ce domaine, il a fallu le scinder en deux parties. La première, qui vient d'être achevée, est consacrée aux aldéhydes. On mesurera l'extension du sujet en sachant que, dans l'édition précédente, une centaine de pages étaient consacrées aux aldéhydes et aux cétones, alors que l'étude de la fonction aldéhyde seule occupe 500 pages dans l'édition actuelle.

Cette étude a été rédigée sous la direction du professeur O. Bayer. Il a fait profiter ses lecteurs, non seulement de sa compétence scientifique, mais aussi de la documentation extrêmement complète des Laboratoires de l'I. G. Farben Industrie. Il en résulte un ouvrage très complet — il tient compte de la littérature parue jusqu'à octobre 1953 — et très clair, dont il n'existe probablement pas, à l'heure actuelle, d'équivalent dans la littérature chimique.

P. K.

Histochemische Methoden. Eine Sammlung herausgegeben von Walther Lipp. N° 1. R. Oldenbourg édit., Munich. Prix du numéro : 6 DM ; abonnement à 6 numéros : 30 DM.

Cette nouvelle revue a pour but de réunir les diverses méthodes histologiques et surtout histochimiques nouvelles qui sont actuellement publiées dans des revues de microbiologie, de médecine humaine et vétérinaire. Résumées avec un plan unique donnant le principe de la méthode, sa technique, ses résultats et leurs discussions, elles constituent une mise à jour permanente facilitant le travail bibliographique et la réalisation des diverses techniques dans les laboratoires.

J. L.

W. Klone. — *Laboratoriumsdiagnose menschlicher Virus- und Rickettsien-infektionen*. 1 vol., 161 p., 10 fig., Springer-Verlag édit., Berlin 1954. Prix : DM 16,80.

Le diagnostic spécifique des infections à virus ou à rickettsies est d'autant plus important du point de vue épidémiologique que le tableau clinique de ces affections est parfois peu caractéristique et que la maladie est souvent inapparente, comme le prouve la présence si fréquente, chez un grand nombre d'individus, d'anticorps vis-à-vis de nombreux virus, sans que ces sujets aient présenté de maladie clinique. Il y a deux moyens de faire un diagnostic d'infection à virus au laboratoire : l'isolement de l'agent infectieux et la mise en évidence d'anticorps spécifiques. L'isolement des virus et des rickettsies est souvent difficile. Cependant diverses méthodes, en particulier l'inocu-

lation à l'animal (et les techniques d'inoculation sont données pour chacune des espèces de laboratoire), et surtout la culture sur l'œuf incubé ou en culture de tissus ont été mises au point et permettent d'obtenir des résultats satisfaisants. L'auteur décrit ces méthodes ainsi que les différentes techniques de coloration et de fixation des virus et des rickettsies et les méthodes de filtration et de centrifugation. Diverses méthodes sérologiques sont applicables aux virus et aux rickettsies : déviation du complément, neutralisation, hémagglutination et inhibition de l'hémagglutination, qui permettent de mettre en évidence des anticorps spécifiques et de faire un diagnostic rétrospectif. Enfin le dernier chapitre de l'ouvrage est consacré à quelques techniques spéciales concernant les rickettsies, les virus du groupe lymphogranulomatose-psittacose, de la rage, de la poliomyélite, etc.

H. T.

Experimental Diabetes and its relation to the clinical Disease. 1 vol., 352 p., Blackwell Scientific Publications, Oxford, édit., 1954. Prix : 35 shillings.

Ce volume réunit les communications présentées au Symposium organisé par The Council for International Organizations of Medical Sciences, qui s'est tenu à Leyde du 14 au 18 juillet 1952, et comprend un grand nombre de notes suivies de leurs discussions. Ces travaux passent en revue l'action des différents agents diabétogènes, les effets des hormones sur le métabolisme glucidique, les interrelations entre les diverses hormones (hypophysaire antérieure, hormone du pancréas, des surrénales) dans la régulation de la glycémie, le métabolisme des graisses, des protéines, le facteur héréditaire, les classifications cliniques du diabète humain, les rapports entre diabète et grossesse, le rôle de l'alloxane dans le diabète sucré, etc.

H. T.

Ciba Foundation Symposium : Peripheral circulation in man. 1 vol., 219 p., J. et A. Churchill édit., Londres, 1954. Prix : 25 shillings.

Ce Symposium fait suite à un premier, consacré à la circulation viscérale. De nombreux savants, appartenant à des disciplines diverses (anatomistes, physiologistes, biophysiciens, anatomo-pathologistes, médecins, chirurgiens), ont pris part à ce Congrès, qui a étudié les méthodes d'examen du courant sanguin, les modifications apportées à la circulation par le froid et la chaleur, l'action de l'adrénaline sur la circulation, la neuro-histologie et le contrôle réflexe de la circulation, l'effet de la sympathectomie, la signification des agglutinines actives à froid et l'influence de l'activité viscérale sur la circulation périphérique. Comme pour les autres Symposiums, chaque communication est suivie de ses discussions.

H. T.

Le Gérant : G. MASSON.